



**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**GRADO EN BIOLOGÍA**  
**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**CURSO ACADÉMICO [2019-2020]**

**TÍTULO:**

**NUEVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO EN  
REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

**AUTOR:**

**YACINE IBELAID FAID**

**TUTOR:**

**LUIS ANTONIO ALCARAZ MAS**



## RESUMEN

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) consiste en el estudio del ADN de un embrión con el fin de detectar la presencia o ausencia de una determinada anomalía genética antes de su transferencia al útero. Esta técnica surgió gracias a la aparición de técnicas de reproducción asistida como son la fecundación in vitro (FIV) y la inyección intracitoplasmática (ICSI). Para obtener el ADN del embrión se llevan a cabo técnicas invasivas (por ejemplo, biopsias de corpúsculo polar, blastómero, trofoectodermo (TE) o blastocentesis) durante los primeros días de desarrollo. Estas técnicas suelen ser caras, de una gran complejidad y pueden afectar a su viabilidad si no se realizan correctamente. Además, durante el desarrollo del embrión son relativamente frecuentes fenómenos como el mosaicismo, los cuales derivan en diagnósticos erróneos, provocando el descarte de embriones sanos (falsos positivos) y/o la selección de embriones alterados (falsos negativos).

En los últimos años, ha surgido una alternativa a todas estas técnicas invasivas, basado en el análisis del “ADN libre” o cfDNA (ADN libre circulante, por sus siglas en inglés) que arroja el embrión al medio de cultivo (SCM, por sus siglas en inglés). Esta fuente de ADN embrionario puede dar información de la ploidía tanto del TE como de la masa celular interna (MCI). Hoy en día, este método tiene una gran limitación, y es la posible contaminación debido a la presencia de una gran cantidad de ADN materno (proveniente de las células del cúmulo) que enmascara los resultados del embrión.

En este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica con la finalidad de describir el DGP, sus aplicaciones y desarrollo a lo largo de la historia de la medicina reproductiva. A su vez, se hace hincapié en los métodos no invasivos recientemente estudiados, esclareciendo la fiabilidad de esta nueva técnica, sus beneficios y limitaciones frente al DGP convencional. Para demostrar la fiabilidad del PGT-A no invasivo (niPGT-A, por sus siglas en inglés), se compararon varios resultados en los que se confrontan los resultados de perfiles obtenidos de niPGT-A con perfiles obtenidos de biopsias de TE, obteniendo tasas de correlación con las biopsias convencionales de un 85% en los últimos estudios. Además, este año 2020 ha salido al mercado el primer test no invasivo, creado por Igenomix, por lo que se explica su utilidad y el sistema de priorización en el que se basa.

**Palabras clave:** diagnóstico genético preimplantacional; PGT-A no invasivo; biopsia de TE; ADN libre circulante; medio de cultivo.

## ABSTRACT

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) involves the study of an embryo's DNA to detect the presence or absence of a certain genetic abnormality before its transfer to the uterus. This technique arose thanks to the emergence of assisted reproductive techniques such as in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic injection (ICSI). To obtain the embryo's DNA, invasive techniques (i.e. polar corpuscle, blastomere, trophoctoderm (TE) biopsies) are performed during the first days of embryo's development. These techniques are usually expensive, very difficult and can affect their viability if not performed correctly. Also, during the development of the embryo are relatively common phenomena such as mosaicism, which lead to erroneous diagnoses, causing the discard of healthy embryos (false positives) and/ or the selection of altered embryos (false negatives).

In the last years, an alternative has emerged to all these invasive techniques, based on the analysis of cfDNA (cell-free DNA) that throws the embryo into the spent culture medium (SCM). This source of embryonic DNA can give information on ploidy of both TE and inner cell mass (ICM). Today, this method has a great limitation, the possible contamination due to the presence of a large amount of maternal DNA (from cumulus cells) that mask the results of the embryo.

In this work a bibliographic review has been carried out to describe the PGD, its applications and development throughout the history of reproductive medicine. In turn, emphasis is placed on the newly studied non-invasive methods, clarifying the reliability of this new technique, its benefits, and limitations over conventional PGD. To demonstrate the reliability of non-invasive PGT-A (niPGT-A), several results were compared between the results of niPGT-A profiles with profiles obtained from TE biopsies, obtaining correlation rates with conventional biopsies of 85% in recent studies. In addition, this year 2020 has launched the first non-invasive test, created by Igenomix, so it explains its usefulness and the prioritization system on which it is based.

**Keywords:** Preimplantation genetic diagnosis; non-invasive PGT-A; TE biopsy; cell-free ADN; spent culture medium.

## ABREVIATURAS

<b>A</b>	<b>A1AD</b>	del inglés <i>Alpha-1 antitrypsin deficiency</i> , deficiencia de alfa-1 antitripsina.
	<b>AMA</b>	del inglés <i>advanced maternal age</i> , edad maternal avanzada.
	<b>ART</b>	del inglés <i>assisted reproduction technologies</i> , tecnologías de reproducción asistida.
	<b>ASRM</b>	del inglés <i>American Society for Reproductive Medicine</i> , Sociedad Americana de Medicina Reproductiva
<b>B</b>	<b>β-Hcg</b>	del inglés <i>human chorionic gonadotropin</i> , gonadotropina coriónica humana beta.
	<b>BF</b>	del inglés <i>blastocoel fluid</i> , líquido blastocélico.
	<b>C</b>	
<b>C</b>	<b>cfDNA</b>	del inglés <i>cell free DNA</i> , ADN libre circulante.
	<b>CGH</b>	del inglés <i>comparative genomic hybridization</i> , hibridación genómica comparativa.
	<b>CN</b>	del inglés <i>copy number</i> , número de copias.
	<b>CV</b>	del inglés <i>coefficient of variation</i> , coeficiente de variación.
<b>D</b>	<b>DGP</b>	diagnóstico genético preimplantacional.
<b>E</b>	<b>ESHRE</b>	del inglés <i>European Society for Human Reproduction and Embryology</i> , Sociedad europea para la reproducción humana y embriología.
<b>F</b>	<b>FISH</b>	del inglés <i>fluorescence in situ hybridization</i> , hibridación fluorescente in situ.
	<b>FNR</b>	del inglés <i>false negative rate</i> , tasa de falsos negativos.
	<b>FPR</b>	del inglés <i>false positive rate</i> , tasa de falsos positivos.
	<b>FIV</b>	fecundación in vitro
<b>H</b>	<b>HLA</b>	del inglés <i>human leukocyte antigen</i> , antígeno leucocitario humano.
<b>I</b>	<b>ICSI</b>	del inglés <i>intracytoplasmic sperm injection</i> , inyección intracitoplasmática de espermatozoides.
	<b>INE</b>	instituto nacional de estadística.
<b>M</b>	<b>mDNA</b>	del inglés, <i>mitochondrial deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico mitocondrial.
	<b>MCI</b>	masa celular interna.

<b>N</b>	<b>nDNA</b>	del inglés, <i>nuclear deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico nuclear.
	<b>NGS</b>	del inglés <i>next generation sequencing</i> , secuenciación de próxima generación.
	<b>niPGT-A</b>	del inglés, <i>non-invasive preimplantational genetic testing for aneuploidies</i> , test genético preimplantacional para aneuploidias no invasivo.
	<b>NPV</b>	del inglés <i>negative predictive value</i> , valor predictivo negativo.
<b>O</b>	<b>OMIM</b>	del inglés, <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> .
	<b>OTC</b>	del inglés, <i>ornithine transcarbamylase</i> , ornitina transcarbamilasa.
<b>P</b>	<b>PCR</b>	del inglés <i>polymerase chaine reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa.
	<b>PGD</b>	del inglés <i>preimplantational genetic diagnosis</i> , diagnóstico genético preimplantacional.
	<b>PGDIS</b>	del inglés <i>Preimplantation Genetic Diagnosis International Society</i> , sociedad internacional de diagnóstico genético preimplantacional.
	<b>PGS</b>	del inglés <i>preimplantational genetic screening</i> , cribado genético preimplantacional.
	<b>PGT-A</b>	del inglés <i>preimplantation genetic testing for aneuploidy</i> , test genético preimplantacional para aneuploidías.
	<b>PGT-M</b>	del inglés <i>preimplantation genetic testing for monogenics</i> , test genético preimplantacional para monogénicas.
	<b>PGT-SR</b>	del inglés <i>preimplantation genetic testing for structural diseases</i> , test genético preimplantacional para anomalías estructurales.
	<b>PPV</b>	del inglés <i>positive predictive value</i> , valor predictivo positivo.
<b>S</b>	<b>SCM</b>	del inglés <i>spent culture medium</i> , medio de cultivo.
	<b>SIG</b>	del inglés <i>Special Interest Group</i> , grupo de interés especial.
	<b>SBM</b>	del inglés <i>spent blastocyst culture medium</i> , medio de cultivo de blastocisto.
<b>T</b>	<b>TE</b>	del inglés <i>trophectoderm</i> , trofoectodermo.
	<b>TPN</b>	del inglés <i>three pronuclear</i> , tres pronúcleos.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Alteraciones genéticas</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Alteraciones numéricas</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2 Alteraciones estructurales</b>	<b>5</b>
<b>1.1.3 Enfermedades monogénicas</b>	<b>5</b>
<b>1.1.4 Enfermedades ligadas a cromosomas sexuales</b>	<b>6</b>
<b>1.1.5 Otras alteraciones</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Contextualizando el DGP</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Indicaciones para el DGP</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Historia del DGP</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Técnicas y métodos para DGP convencional</b>	<b>13</b>
<b>1.5.1 Técnicas de biopsia</b>	<b>13</b>
<b>1.5.2 Técnicas DGP</b>	<b>16</b>
<b>1.6 niPGT-A</b>	<b>17</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Objetivo general</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	<b>26</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>46</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>49</b>



## INDICE DE FIGURAS

- Fig. 1. Representación gráfica del procedimiento realizado en un PGD.*  
*Fig. 2. Representación gráfica del aumento de embriones aneuploides con la edad materna.*  
*Fig. 3. Técnica FISH.*  
*Fig. 4. Biopsia de corpúsculo polar.*  
*Fig. 5. Biopsia de blastómero.*  
*Fig. 6. Biopsia de trofoectodermo en día 5-6.*  
*Fig. 7. Cariotipo de trisomía en el cromosoma 21 o Síndrome de Down.*  
*Fig. 8. Ejemplo de triploidía por cariotipo 69XXX.*  
*Fig. 9. Representación gráfica del falso negativo y falso positivo.*  
*Fig. 10. Figura que representa la clasificación de los distintos tipos de mosaicismo.* *Fig. 11. Sistema de puntuación para los blastocistos.*  
*Fig. 12. Modus operandi de un estudio con el fin de analizar la viabilidad del niPGT-A.*  
*Fig. 13. Gráfica de cajas que muestra la media de concentración de DNA (pg) en muestras sin amplificar (izquierda) y muestras amplificadas (derecha) según la ploidía del embrión.*  
*Fig. 14. Gráfica de cajas que muestra la media de concentración de DNA (pg) en muestras sin amplificar (izquierda) y muestras amplificadas (derecha) según el sexo del embrión.*  
*Fig. 15. Perfiles embrión A24.*  
*Fig. 16. Perfiles embrión A14.*  
*Fig. 17. Perfiles embrión A46.*  
*Fig. 18. Perfiles embrión A46.*  
*Fig. 19. Representación de los distintos niveles de limitación establecidos para minimizar los diagnósticos erróneos.*  
*Fig. 20. Representación sobre la tasa de concordancia entre ambos métodos (Biopsia TE vs niPGT-A) en relación a la edad materna.*  
*Fig. 21. Representación sobre la tasa de concordancia entre ambos métodos (Biopsia TE vs niPGT-A) con relación al medio de cultivo obtenido de las distintas clínicas.*  
*Fig. 22. Representación sobre la tasa de concordancia entre ambos métodos (Biopsia TE vs niPGT-A) en relación con el modelo de incubador utilizado.*  
*Fig. 23. Perfiles concordantes obtenidos tras secuenciación de biopsias de TE y biopsia de MCI vs cfDNA del SBM.*  
*Fig. 24. Perfiles no concordantes obtenidos tras secuenciación de biopsias de TE y biopsia de MCI vs cfDNA del SBM.*  
*Fig. 25. Perfiles no concordantes obtenidos tras secuenciación de biopsias de TE y biopsia de MCI vs cfDNA del SBM.*  
*Fig. 26. Gráfica sobre la tasa de euploidía o “Euploidy score” en 4 embriones. En el eje vertical se representa en % de euploidía y en el horizontal los distintos embriones analizados.*

## INDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Número de entradas en OMIM.*  
*Tabla 2. Número de fenotipos que dan lugar a desordenes o que son susceptibles a enfermedades.*  
*Tabla 3. Cronograma.*  
*Tabla 4. Tabla que muestra los estudios más importantes, sus características y resultados en porcentaje de concordancia.*  
*Tabla 5. Interpretaciones de la CN de un cromosoma tras el límite de 60% establecido por Huang et al.*  
*Tabla 6. Fórmulas aplicadas para obtener el valor predictivo positivo (PPV), el valor predictivo negativo (NPV) y la especificidad.*



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Alteraciones genéticas

Actualmente, existen más de 5000 enfermedades genéticas de todo tipo descritas en la base de datos de la OMIM (del inglés, *Online Mendelian Inheritance in Man*) (Tabla 1 y Tabla 2). De ellas, el 70% de los abortos están causados por alteraciones en los cromosomas 13,14,15,16,18,21,22, X e Y. Por tanto, estas parejas cromosómicas son las más estudiadas en el diagnóstico genético preimplantacional (DGP).

**Tabla 1. Número de entradas en OMIM.** (actualizado el 18 de marzo de 2020).

MIM Number Prefix	Autosomal	X Linked	Y Linked	Mitochondrial	Totals
Gene description *	15,429	738	51	37	16,255
Gene and phenotype, combined +	35	0	0	0	35
Phenotype description, molecular basis known #	5,373	344	5	33	5,755
Phenotype description or locus, molecular basis unknown %	1,424	118	4	0	1,546
Other, mainly phenotypes with suspected mendelian basis	1,670	104	3	0	1,777
Totals	23,931	1,304	63	70	25,368

**Tabla 2. Número de fenotipos que dan lugar a desordenes o que son susceptibles a enfermedades.** (actualizado el 18 de marzo de 2020).

Class of phenotype	Phenotype	Gene *
Single gene disorders and traits	5,555	3,862
Susceptibility to complex disease or infection	695	502
"Nondiseases"	148	116
Somatic cell genetic disease	229	129

La renovación que se da a cabo en todas las células de un organismo surge gracias a su propia división, dando lugar a dos células hijas por cada célula que se divide. Durante este proceso de división pueden producirse errores que darán lugar a alteraciones genéticas. Estos errores pueden darse por factores externos (de tipo ambiental) o factores internos (de tipo genético).

Si la alteración afecta solamente a la célula en la que se ha dado el error, estaríamos ante una alteración somática que no va a transmitirse a la descendencia.

En cambio, si la alteración afecta a una de las células germinativas (óvulos y/o espermatozoides), acabará transmitiéndose al cigoto, quedando presente en todas sus células. Además, también puede darse una alteración durante la embriogénesis, proceso

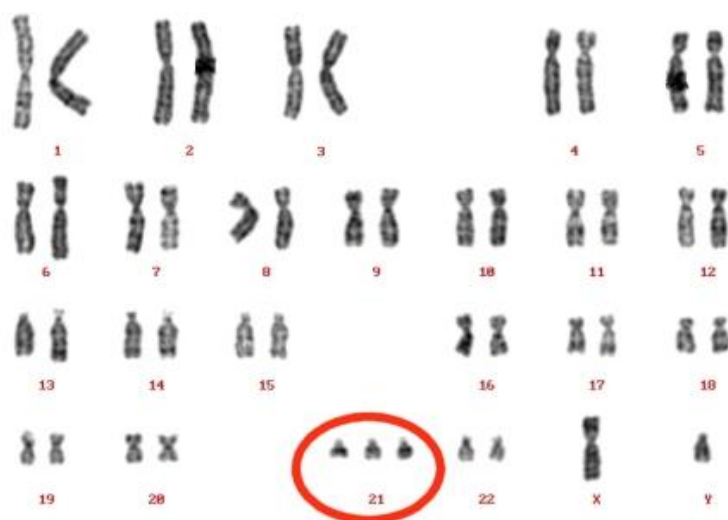
de transformación del cigoto a un embrión. En los dos casos se denominan alteraciones germinales, y estas sí, pueden transmitirse a la descendencia.

Según a la cantidad de información a la que afecten estas alteraciones, podemos encontrar distintos tipos de mutaciones: cromosómicas, si afectan a cromosomas tanto a nivel estructural como numérico; génicas, si afectan a un gen o multifactoriales, cuando afectan a dos o más genes.

### 1.1.1 Alteraciones numéricas

Las anomalías cromosómicas son una de las principales alteraciones estudiadas en el DGP. Hay dos tipos, según si afecta al número de cromosomas (numéricas), o si afecta a la morfología de los cromosomas (estructurales).

Las alteraciones numéricas pueden ser aneuploidías o poliploidías; las aneuploidías son la forma más común de anomalía genética y la principal causa de aborto e infertilidad (Treff y Zimmerman, 2017). Se da por una cantidad de cromosomas superior o inferior al número normal (46 cromosomas), pudiendo ser trisomías, como por ejemplo el síndrome de Down (trisomía del 21) o monosomías como en el síndrome de Turner (monosomía en el cromosoma X). Además, como se verá más adelante, la prevalencia de las aneuploidías aumenta en gran medida con la edad materna (Munné, 2012). El cariotipo tradicional es la técnica más común para observar las aneuploidías en sangre, como en la *Figura 1* dónde podemos observar un cariotipo de un individuo que padece trisomía del 21 o Síndrome de Down.



**Fig. 1. Cariotipo de trisomía en el cromosoma 21 o Síndrome de Down.** Figura en la que se pueden ver representados los cromosomas de un cariotipo. En este caso, todos los autosomas tienen dos copias en cada cromosoma excepto en el cromosoma número 21, dónde podemos ver 3 copias (47, XY, +21). (Downmx.com).

Entre las poliploidías, se encuentra la triploidía, una anomalía cromosómica muy rara que ocurre en el 1% de las concepciones (Toufaily *et al.*, 2016), y sucede cuando aparecen 3 pronúcleos en vez de 2. Así, en lugar de haber 46 cromosomas, nos encontramos con 69 (Figura 2). La mayoría provocan abortos espontáneos durante el primer trimestre, siendo esta anomalía la responsable del 20% de los abortos espontáneos. Sólo 1 de cada 1000 pueden llegar a término, aunque no puedan superar el año de vida, siendo la tasa de mortalidad de estos sujetos del 100% al año de vida. El caso con supervivencia extrauterina más prolongada fue de 11 meses (Mittal *et al.*, 1998). Además, este tipo de embarazos de embriones poliploides pueden originar lo que se denomina un embarazo molar o mola hidatiforme, causado por un crecimiento anormal de trofoblastos. La mola hidatiforme generalmente produce un aborto al comienzo del embarazo, pero puede presentar serias complicaciones como una neoplasia trofoblástica gestacional que requiera una histerectomía<sup>1</sup>.



**Fig. 2. Ejemplo de triploidía por cariotipo.** Figura en la que se ven representados los cromosomas de un cariotipo anormal. En vez de tener 46 cromosomas vemos 3 copias en cada cromosoma, sumando un total de 69 cromosomas. (69XXX). (Asociación Española de Genética Humana. (Alteraciones cromosómicas: aegh.org, 2018).

<sup>1</sup>La **histerectomía** es el proceso en el que se extrae el útero de la mujer, con el fin de interrumpir los períodos menstruales y evitar un nuevo embarazo. Habitualmente, se recomienda una histerectomía en casos de cáncer uterino, endometriosis, fibromas etc.

La prevalencia de cigotos con tres pronúcleos (TPN) está entre 6 y 8% en ciclos de FIV convencionales (Porter *et al.*, 2003) y entre 2.5 y 6% en ciclos de ICSI (Porter *et al.*, 2003). Estos casos son descartados en clínicas de reproducción por el riesgo que conllevan, aunque exista una gran evidencia de que alrededor de la mitad de los cigotos TPN fertilizados con ICSI pueden corregirse y derivar en un cigoto diploide (Grau *et al.*, 2015).

Existen dos tipos de triploidía según el origen del juego extra de cromosomas, digínica si el juego extra es de origen materno o diándrica si es de origen paterno. La triploidía diándrica puede darse por la aportación de dos gametos haploides masculinos o un gameto diploide, además del gameto haploide aportado por la madre. En cuanto al fenotipo de esta triploidía, el crecimiento intrauterino es normal, pero aparece la placenta molar previamente mencionada.

En los dos tipos de triploidía aparecen malformaciones en cabeza, extremidades o corazón. La malformación más común es la sindactilia, una de las malformaciones hereditarias más comunes de las extremidades que provocan la fusión de los dedos de manos y pies (Malik, 2012) y está presente en el 65% de los abortos por triploidía (Mittal *et al.*, 1998). Además, otros fenotipos como: la inmadurez, hipotonía muscular, microftalmia y orejas dismórficas son comunes en casos de triploidía.

Las técnicas basadas en los polimorfismos de una sola base (SNP) son las únicas capaces de detectar las triploidías de origen paterno. Las triploidías de origen materno pueden ser detectadas con NGS o mediante la examinación al microscopio de los ovocitos 18 horas después de la inseminación.

Por lo tanto, es necesario abordar nuevos métodos para detectar la triploidía y disminuir así los embarazos con cariotipos triploides. Ayudando así a mejorar la tasa de implantación exitosa y disminuyendo el número de abortos espontáneos

Las tetraploidías, al igual que las triploidías, son alteraciones en el número de todos los cromosomas. En este caso, el individuo afectado, presenta cuatro copias de cada cromosoma, dando lugar a un total de 92 cromosomas en cada célula. La frecuencia de tetraploidía en un cigoto es de 0.7%. Las consecuencias de esta alteración son trascendentales, en la mayoría de los casos se asocia con el aborto involuntario. Provoca varias anomalías congénitas, que incluyen malformaciones del sistema nervioso central, así como defectos en las extremidades. Además, la mayoría de los afectados presentan un retraso intrauterino grave, hipotonía y retraso en el desarrollo según el ORPHANET.

### **1.1.2 Alteraciones estructurales**

Las alteraciones estructurales abarcan varias perturbaciones morfológicas de los cromosomas causadas por la ruptura o la unión incorrecta de distintos segmentos cromosómicos. Si tras la reorganización estructural, el conjunto cromosómico está completo, hablamos de reorganización equilibrada. Entre las alteraciones equilibradas encontramos regiones cromosómicas invertidas o translocadas. Generalmente, estas alteraciones pasan desapercibidas, pero pueden desencadenar en enfermedad si afectan a un gen, lo que provoca la ausencia de la proteína codificada por el gen o la ausencia de su funcionalidad. También puede generarse un híbrido de dos genes debido a la fusión de los segmentos cromosómicos dando lugar a una nueva proteína cuya función puede ser perjudicial para la célula en cuestión. No obstante, cuando uno de los progenitores es portador de una alteración balanceada, el embrión tiene mayor riesgo de heredar una aberración no equilibrada que, generalmente, será patogénica. Estas alteraciones no equilibradas resultan en fallos en el embarazo que derivan en abortos espontáneos, y en el caso de llegar al nacimiento, poseen serios daños en la salud del niño. Entre estas alteraciones podemos encontrar deleciones (pérdida de material genético), duplicaciones (aumento del material genético) o inserciones. Además, si un cromosoma sufre una rotura en sus dos extremos, pueden unirse y generar un “cromosoma en anillo”. Asimismo, si falta un brazo de un cromosoma y se duplica el brazo restante, hablaríamos de un “isocromosma”.

Dentro de este tipo de alteraciones se engloban también las microdeleciones y microduplicaciones, en las cuales una parte de un cromosoma (que puede ir de unas pocas kilobases a varias megabases) se encuentra delecionada o duplicada. En ocasiones, este tipo de alteraciones puede originar problemas neurológicos graves, malformaciones y múltiples anomalías congénitas.

### **1.1.3 Enfermedades monogénicas**

Las enfermedades monogénicas son aquellas producidas por alteraciones en la secuencia de ADN de un solo gen. En la actualidad se conocen miles de estas patologías. La mayoría de ellas son enfermedades raras, pero, tomadas en conjunto, son la causa más frecuente de anomalías genéticas. Se clasifican como dominantes o recesivas. Si es suficiente con heredar el gen defectuoso de un solo progenitor para padecer la

enfermedad, estaríamos ante una enfermedad de carácter dominante, como el caso de la Enfermedad de Huntington; aquí el progenitor portador de la mutación está afectado, y tiene una probabilidad del 50% de transmitir la patología a su descendencia. En el caso contrario, tendrá que heredar el gen defectuoso de los dos progenitores para heredar la enfermedad (recesiva), como en la Fibrosis Quística. En este último, los progenitores son portadores sanos, pero tienen una probabilidad de un 25% de tener un hijo afectado por la enfermedad.

#### **1.1.4 Enfermedades ligadas a cromosomas sexuales**

Son un tipo especial de enfermedades monogénicas debido a que se producen en los cromosomas sexuales en lugar de los autosómicos. Hay más de 1000 enfermedades ligadas al cromosoma X, siendo las más relevantes la hemofilia A o B (Fiorentino *et al.*,2005), la distrofia muscular de Duchenne (Bianco *et al.*,2017) o el síndrome de X frágil (Verdyck *et al.*,2015). Las más frecuentes son las ligadas al X recesivas. En este tipo de patologías, las mujeres suelen ser portadoras sanas, pero tienen un riesgo del 50% de transmitir la patología a un hijo varón (si tuviera una hija, sería portadora sana, como la madre). También tenemos patologías ligadas al X dominante, en las cuales las mujeres son siempre afectas y, muchas veces, son letales para varones. Sin embargo, el término dominante y recesivo en patología ligada al X debe ser tomado con precaución, porque hay mayor variabilidad que en los genes autosómicos. Esto es debido al fenómeno de inactivación al azar del cromosoma X. Este fenómeno consiste en la inactivación completa de uno de los dos cromosomas X durante las primeras etapas del embrión. Dado que esta inactivación no es igual en todas las células, pero se transmite de células madre a hijas, un heterocigoto para una patología ligada al X se comporta como un mosaico con dos poblaciones celulares: una que expresa el cromosoma normal y otra que expresa el portador de la mutación.

Asimismo, también están las enfermedades ligadas al cromosoma Y, mucho menos frecuentes que las anteriormente mencionadas. En este caso, sólo los varones podrán padecer la enfermedad.



### 1.1.5 Otras alteraciones

Además, podemos encontrar otro tipo de enfermedades genéticas menos comunes como las siguientes:

- Enfermedades multifactoriales: son anomalías provocadas por factores genéticos además de factores ambientales. Un ejemplo es la Enfermedad de Alzheimer o el autismo.
- Enfermedades mitocondriales: son desórdenes provocados por la deficiencia de alguna proteína localizada en las mitocondrias debido a una alteración del ADN mitocondrial. Sólo son transmitidas por la madre. El Síndrome de Alpers o Polidistrofia esclerosante progresiva de Alpers es un ejemplo de enfermedad mitocondrial.
- Mutaciones somáticas: son alteraciones en las células somáticas que pueden derivar en cáncer u otras enfermedades.

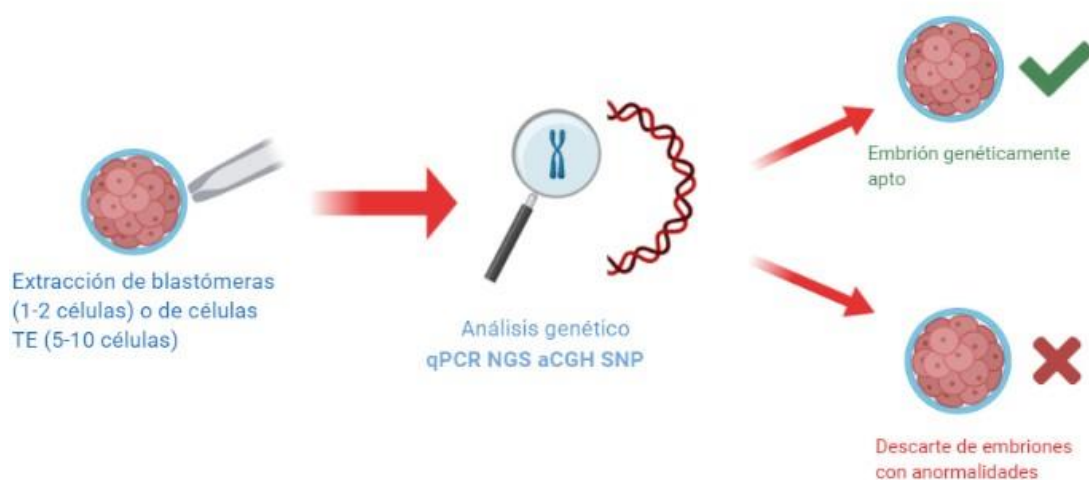
## 1.2 Contextualizando el DGP

Los avances logrados en el ámbito de la biomedicina son innumerables en los últimos años. Uno de los de mayor crecimiento es el relacionado con las técnicas y los métodos de diagnóstico en la medicina reproductiva, debido a que los cambios socioculturales están provocando una paternidad más tardía. Así, son de gran importancia los cambios en las técnicas de reproducción asistida (ART, por sus siglas en inglés, *assisted reproduction technologies*), ofreciendo la posibilidad de reducir los casos de abortos espontáneos y nacimientos con malformaciones. Un buen ejemplo de dicha mejora en las técnicas de diagnóstico lo encontramos en el diagnóstico genético preimplantacional (DGP).

El DGP es un procedimiento realizado para detectar y/o prevenir distintas anomalías genéticas en embriones antes de ser transferidos al útero. Dentro del DGP, según el objetivo a analizar, existen dos variantes: para la detección de aneuploidías (PGT-A, por sus siglas en inglés, *Preimplantational Genetic Testig for Aneuploidies*) o para la detección de enfermedades monogénicas (PGT-M, por sus siglas en inglés, *Preimplantational Genetic Testing for Monogenic diseases*). El PGT-M fue la primera técnica en desarrollarse, y nace a raíz de la aparición de nuevas ART como la fecundación in vitro (FIV, del inglés *in vitro fertilisation*) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, del inglés *intracytoplasmic sperm injection*).

En el DGP se pueden detectar tanto anomalías cromosómicas como mutaciones en el ADN genómico, incluso para el estudio de antígenos leucocitarios humanos (HLA, del

inglés *Human leukocyte antigen*) con el objetivo principal de seleccionar aquellos embriones libres de esa carga genética asociada a determinadas enfermedades (*Figura 3*) (Harper y Sioban, 2011). Surgió como alternativa a los test prenatales tradicionales como la amniocentesis o la biopsia de vellosidades coriónicas. Pese a que las técnicas prenatales son capaces de identificar con mucha fiabilidad los fetos con anomalías genéticas, suponen un problema tanto ético como moral a la pareja a la hora de la toma de decisiones por el resultado de la prueba genética. En cambio, el DGP evita la opción de la interrupción voluntaria del embarazo, seleccionando los embriones no afectados por ningún desorden (Bick y Lau, 2006).



**Fig 3. Representación gráfica del procedimiento realizado en un DGP.** (<https://biorender.com/>) TE: del inglés *trophectoderm*, qPCR: del inglés *quantitative PCR*, NGS: del inglés *next generation sequencing*, aCGH: del inglés *array comparative genomic hybridization*, SNP: del inglés *single-nucleotide polymorphism*.

Por lo tanto, dentro del DGP podemos encontrar, según el objetivo del análisis, tres tipos:

- PGT-A (del inglés, *Preimplantation Genetic Testing for aneuploidy*): análisis para diagnosticar anomalías numéricas en los cromosomas, denominadas aneuploidías. Monosomías, trisomías etc.
- PGT-M (del inglés, *Preimplantation Genetic Testing for monogenic diseases*): con el fin de detectar enfermedades provocadas por la mutación en la secuencia de ADN de un solo gen. Un ejemplo es la fibrosis quística.
- PGT-SR (del inglés, *Preimplantation Genetic Testing for structural rearrangement*): para el diagnóstico de anomalías que afectan a la estructura de

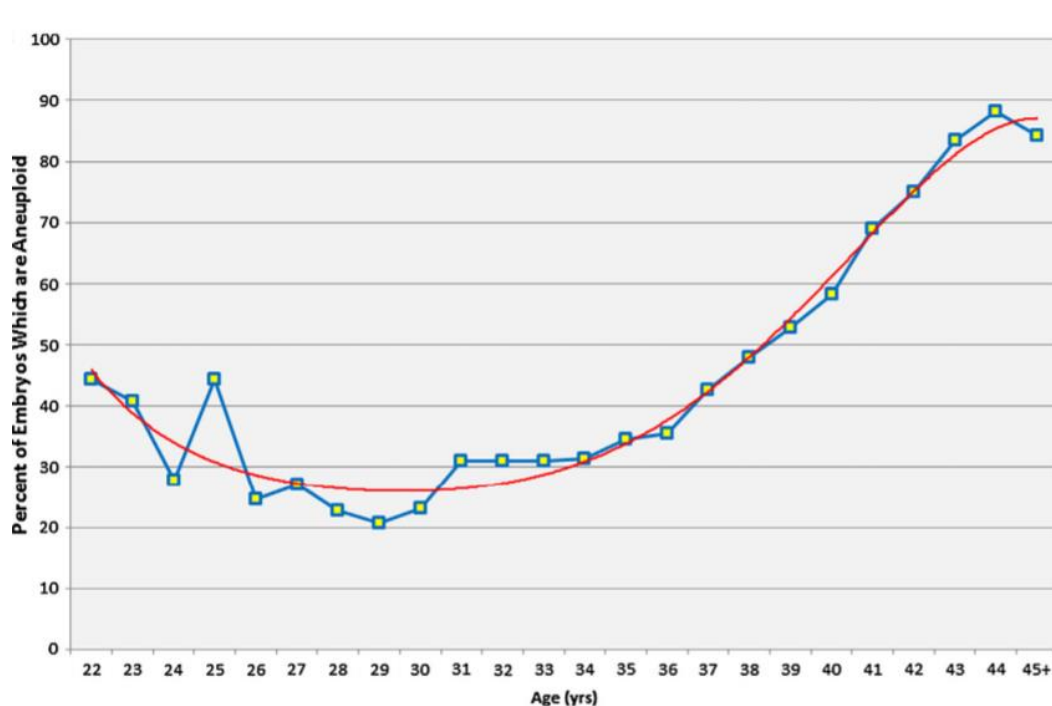
uno o varios cromosomas, como las translocaciones balanceadas, inversiones, etc.

Las dos sociedades más importantes en el ámbito de las técnicas de reproducción asistida como son la ESHRE (*European Society for Human Reproduction y Embryology*) y la ASRM (*American Society for Reproductive Medicine*), han establecido el término PGT (del inglés, *Preimplantation Genetic Testing*) para sustituir la tradicional terminología que hacía referencia al DGP. Por lo tanto, toda información obtenida desde el año 2019 se verá reflejada con la nueva terminología.

### **1.3 Indicaciones para el DGP**

Las principales indicaciones para realizar el DGP/PGT-A son, edad materna avanzada (AMA, del inglés *advanced maternal age*) y abortos recurrentes (Dahdouh *et al.*, 2015), aunque también existen otros factores como la infertilidad masculina severa (oligospermia).

La AMA es uno de los factores de riesgo más importantes en un embarazo, siendo la indicación más frecuente para realizar un DGP. El porcentaje de embriones afectados por una aneuploidía aumenta con la edad materna, llegando al 80% en casos de mujeres mayores de 40 años (Munné *et al.*, 2007). Estas anormalidades provocan un descenso en la tasa de implantación en FIV, pasando del habitual 30% de tasa de implantación en mujeres menores de 35 años hasta un 6% en mujeres mayores de 40 años (Munné, 2012). Así, la probabilidad de generar embriones aneuploides aumenta sustancialmente con la edad de la madre (*Figura 4*).



**Fig. 4. Aumento de embriones aneuploides con la edad materna.** Representación esquemática en la que se ve en el eje vertical el porcentaje de embriones aneuploides y en el eje horizontal la edad materna. Se observa un aumento lineal del porcentaje de embriones aneuploides con la edad materna (Franasaik et al., 2014).

Este efecto de la edad materna avanzada sobre la fecundabilidad de la mujer se corrige en cierto modo gracias a la implantación del DGP. Una vez seleccionados los embriones euploides, la probabilidad de embarazo por transferencia es prácticamente la misma en una mujer de 30 años que en una de más de 40. Debido a que la maternidad en España se ha ido retrasando (actualmente la edad a la cual se tiene el primer hijo está en 33 años, según el Instituto Nacional de la Estadística), la importancia de un diagnóstico acompañando al proceso de FIV se ha visto incrementada (Rubio *et al.*, 2017). En mujeres de más de 40 años la tasa de implantación pasa de menos del 10% hasta un 40% con el uso del DGP, como en mujeres menores de 39 años, pasando de una tasa del 47% hasta un 66,7% con DGP.

En el caso de las pacientes de clínicas de reproducción asistida que han tenido abortos recurrentes, en un porcentaje elevado, los embriones presentan anomalías cromosómicas, por lo que el uso del DGP es importante debido a su capacidad demostrada de disminución en los casos de aborto (Munné *et al.*, 2005). Alrededor del 25% de las parejas que han sufrido abortos espontáneos presenta todos los embriones de un ciclo con cromosomas anormales (Rubio *et al.*, 2005).

El uso del DGP en casos de infertilidad masculina es otra de las indicaciones más importantes para su realización antes de la fecundación. Entre todas las causas que pueden provocar la infertilidad masculina, existen casos de hombres con cariotipo normal y factor masculino severo con espermatozoides cromosómicamente anormales. En un estudio, se demostró que el 79% de los espermatozoides en casos de factor masculino severo sufren un incremento en el porcentaje de aneuploidía comparándolos con el control (Gianaroli *et al.*, 2005).

Igualmente, en casos de infertilidad masculina candidatos a realizar un ICSI, se han hallado alrededor de un 5% de casos con anormalidades cromosómicas constitucionales, translocaciones, y casos de Síndrome de Klinefelter (Foresta *et al.*, 2005).

### **1.4 Historia del DGP**

El primer dato que se tiene de una biopsia de embrión fue llevada a cabo por Gardner y Edwards en 1968. Su objetivo era determinar el sexo de la descendencia de distintos mamíferos mediante la separación de los cromosomas sexuales en el espermatozoide. Fueron incapaces, pero propusieron averiguar el sexo del embrión antes de implantarlos. Gracias a la cromatina sexual (ahora denominada corpúsculo de Barr) y a la microscopía de fluorescencia, demostraron que se podía sexar el embrión de un conejo hembra identificando esta cromatina sexual en las células trofoblásticas (Gardner y Edwards, 1968).

Pero no fue hasta la aparición de la fecundación *in vitro* (FIV) cuando se comenzaron a realizar nuevos avances en el DGP. La FIV es considerada el pilar de las tecnologías de reproducción asistida y se consiguió por primera vez mediante la aspiración de un ovocito el cual se fecundó y se implantó en el útero dos días después (Steptoe y Edwards, 1978).

Durante la década siguiente, los estudios con animales pavimentaron el camino hacia el uso del DGP en humanos. Marily Monk demostró que se podía detectar un desorden genético biopsiando blastómeros de ratones, gracias a su capacidad para sexar los embriones mediante el análisis de compuestos ligados al cromosoma X y al resto de autosomas (Monk y Handyside, 1988).

En el año 1986 el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chaine reaction*) abrió un nuevo camino al mundo del DGP y en 1990, un grupo de científicos del Reino Unido consiguió determinar el sexo de un embrión de

una pareja con riesgo de tener descendencia con deficiencia de ornitina transcarbamilasa (OTC, del inglés, *ornithine transcarbamylase*) (Handyside *et al.*, 1990).

La primera aplicación clínica fue reportada en un congreso internacional de FIV celebrado en 1987, aunque la primera publicación al respecto llegó en 1990, cuando Verlinsky y su grupo realizaron un DGP con el fin de detectar una deficiencia de alfa-1 antitripsina (A1AD; del inglés *Alpha-1 antitrypsin deficiency*) mediante la biopsia de corpúsculo polar y usando la PCR para el análisis (Verlinsky *et al.*, 1990). Verlinsky fue seguido por otros científicos como Strom, quién detectó la fibrosis quística mediante el DGP de una biopsia de corpúsculo polar (Strom *et al.*, 1990).

El progreso en la detección de anomalías cromosómicas llegó con el desarrollo de la hibridación fluorescente in-situ (FISH). Los primeros en aplicar dicha técnica fueron, Darren Griffin y sus compañeros, en Europa, primeros en desarrollar con éxito el FISH para sexar embriones con riesgo de padecer enfermedades ligadas a X (Griffin *et al.*, 1991), y Jamie Grifo hizo lo propio en Estados Unidos (Grifo *et al.*, 1990, 1992).

Un año después, Santiago Munné, uno de los ingenieros genéticos más importantes de la época, se unió a al grupo de Grifo, aplicando el FISH-DGP con el fin de detectar translocaciones cromosómicas (Munné *et al.*, 1998).

Los años 90 fueron el inicio del DGP, creándose el “*International Working Group on Preimplantation Genetics*”, celebrándose la primera reunión dedicada especialmente al DGP (Verlinsky *et al.*, 1991). Este grupo revisa anualmente el estado del DGP a nivel internacional.

En España, gracias a la colaboración de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) y el Instituto Universitario Dexeus se consiguió el primer embarazo con la aplicación del DGP en el año 1994, en un caso en el que la madre era portadora de la hemofilia. Finalmente, el embarazo fue un éxito, dando lugar a dos niñas completamente sanas (Veiga *et al.*, 1994).

Además, gracias al uso de la PCR para el estudio de enfermedades monogénicas se diagnosticó por primera vez en España, mediante el DGP, un caso de fibrosis quística. Fue realizado en el Hospital La Fe de Valencia junto al Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) en el año 2000. Un año después, el equipo de reproducción de la Fundación Jiménez Díaz consiguió emular la hazaña, esta vez con el diagnóstico de la enfermedad de Huntington (Carmona, 2015).

En el año 2003, el “*International Working Group on Preimplantation Genetics*” se convirtió en el PGDIS (del inglés, *Preimplantation Genetic Diagnosis International*

*Society*). En su primera reunión celebrada en 2005, se nombró presidente a Yury Verlinsky, el fundador del DGP. Actualmente, el presidente del PGDIS es David Cram.

En Europa, el DGP está organizado por la ESHRE, donde un grupo de expertos en pruebas genéticas preimplantatorias han creado un SIG (del inglés, *Special Interest Group*) en DGP, liderado actualmente por la doctora Cristina Magli.

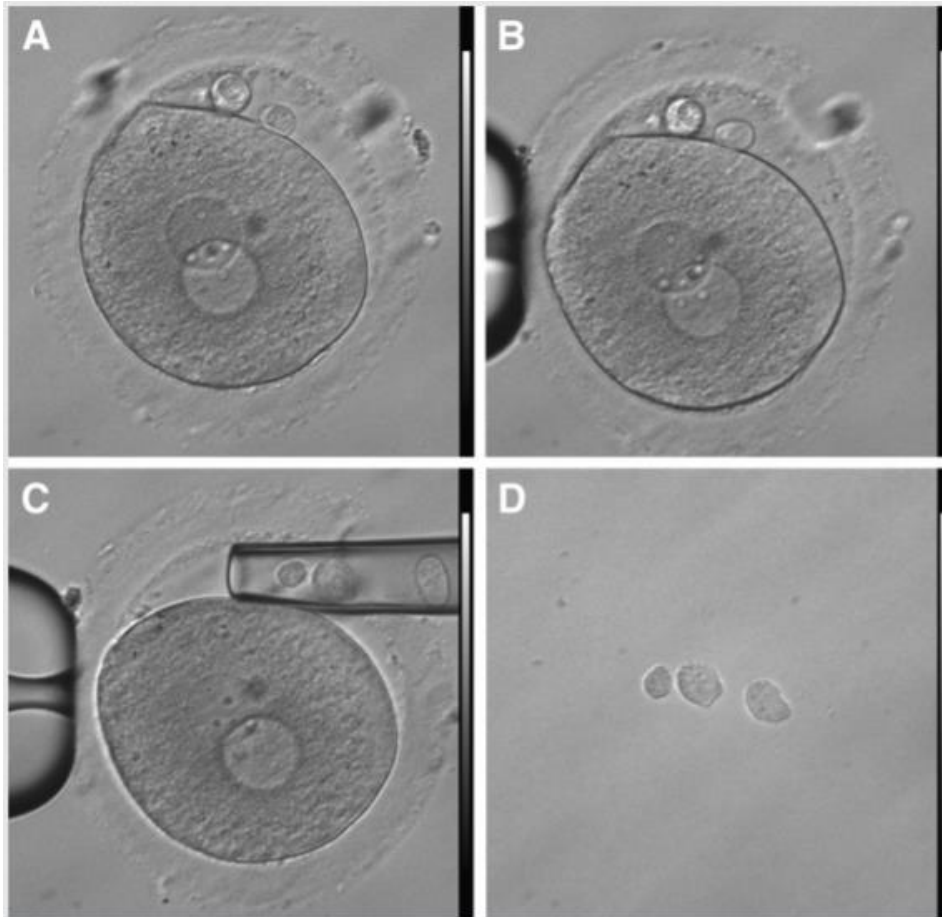
## **1.5 Técnicas y métodos para DGP convencional**

### **1.5.1 Técnicas de biopsia**

Para realizar el DGP, es necesaria la obtención previa del ADN de los gametos o embriones antes del día 6 desde la fertilización, que es el día en el que se lleva a cabo la transferencia uterina. Existen tres métodos de biopsia que han ido evolucionando y mejorando a lo largo de los años: biopsia del corpúsculo polar, biopsia del blastómero (realizado en el día 3 de desarrollo embrionario) y biopsia del trofoectodermo (en día 5). Siendo el último mencionado el más usado hoy en día debido a su baja tasa de errores en el diagnóstico (Munné *et al.*, 1997), su rentabilidad (Greco *et al.*, 2015) y su seguridad para el embrión.

Según la bibliografía, es recomendable realizar la microinyección intracitoplasmática (ICSI) para dar lugar a los embriones que se vayan a biopsiar. Por el hecho de que con esta técnica se evita la aparición de espermatozoides y células de la granulosa adheridas a la zona pelúcida que pueden provocar contaminación durante el análisis genético.

- Biopsia de corpúsculo polar (*Figura 5*): es el método menos usado hoy en día. Consiste en la aspiración de uno o dos de los corpúsculos polares (CP) del ovocito. Esta técnica está en desuso por el hecho de que la información que nos ofrece está limitada al ovocito, por lo que si existe alguna mutación o translocación derivada del padre no servirá de nada (Sapulveda y Portella, 2012). Además, es necesario realizar el análisis de ambos corpúsculos polares para tener la información más completa posible. Es una alternativa realizada en aquellos países en los que la biopsia embrionaria no está permitida (Montag *et al.*, 2013).

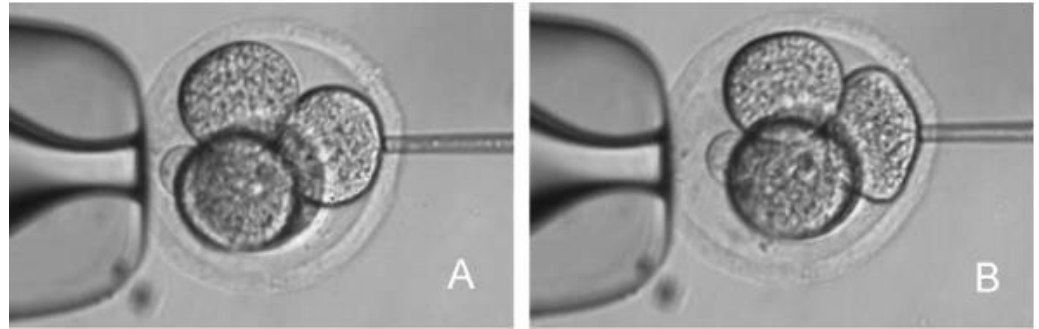


**Fig. 5. Biopsia de corpúsculo polar.** Tras el posicionamiento de los ovocitos con los corpúsculos polares en el plano focal (A), se abre mediante el lanzamiento de 2-3 disparos láser (B). A través de la abertura se introduce el capilar para aspirar los corpúsculos polares (C), los cuales son depositados separados para su procesamiento (D) (Montag et al.,2013).

- Biopsia de blastómeros (*Figura 6*): se realiza en el día 3 de desarrollo del embrión, cuando posee entre 6 y 8 células. El número de blastómeros que se extraen depende de la calidad del embrión y del análisis que se vaya a realizar. Pese a que la biopsia de trofoectodermo está sustituyendo a la biopsia de blastómero, según la Sociedad Europea de Reproducción Humana (ESHRE), la biopsia de blastómeros ha sido usado en >87% de los ciclos de DGP realizados durante más de 10 años. Si se extrae la célula en la fase de 4 células se reducirá la relación de la masa celular interna con el trofoectodermo (Moreno,2006). Sin embargo, al realizar la biopsia en la etapa de 8 células no existe ningún peligro para el desarrollo del blastocisto debido al alto índice mitótico, lo que compensa la célula extraída (Cieslakjanzen *et al.*, 2006). Sin embargo, el gran problema que presenta esta técnica, especialmente para PGT-A, es el mosaicismo: la información obtenida de una única célula puede no ser representativa de todo el embrión. De hecho, actualmente se considera que

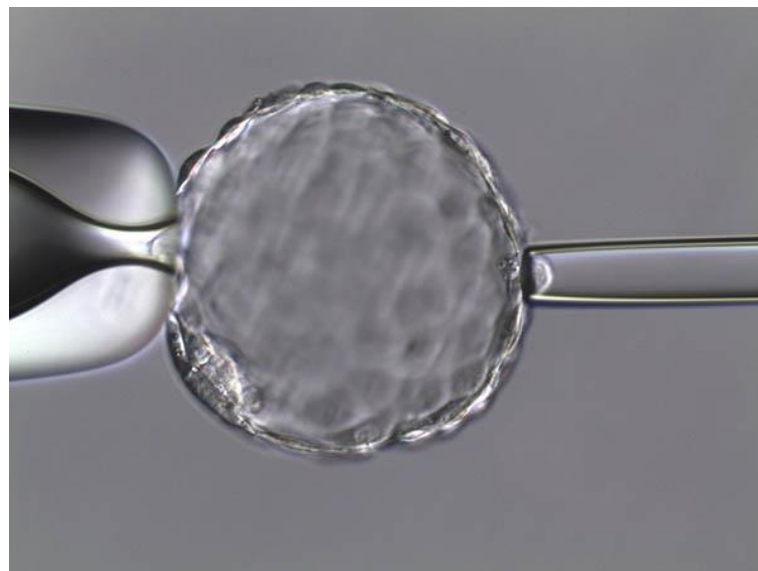


aproximadamente un 20% de los embriones seleccionados por PGT-A pueden haber sido diagnosticados erróneamente por este hecho.



**Fig. 6. Biopsia de blastómero.** Primero se penetra la zona pelúcida (ZP, del inglés zona pellucida) mediante un pulso eléctrico (A). Tras expulsar el segmento de ZP, se vuelve a introducir la pipeta para aspirar uno de los blastómeros (B) (Ugajin *et al.*, 2010).

- Biopsia de blastocisto (TE) (*Figura 7*): esta técnica es la más fiable y con menos impacto de las tres debido a la gran cantidad de células que presenta el embrión en los días 5 y 6 de desarrollo. Consiste en la biopsia de entre 5 y 10 células de la capa del trofocotodermo de un blastocisto, asistida por láser. Permite utilizar más células para el diagnóstico, aumentando la fiabilidad del estudio. El problema es que al estar en día 6, día de implantación, es necesario criopreservarlos hasta obtener los resultados. Esta criopreservación puede disminuir la viabilidad del embrión y aumentar el riesgo de provocar trastornos hipertensivos (Maheswari *et al.*, 2017).



**Fig. 7. Biopsia de trofoectodermo en día 5-6.** En esta biopsia se extraen 4-5 células del TE, se coloca la MCI en el lado contrario al de la extracción para evitar posibles daños. Por lo general, se usan pulsos cortos de láser como en la imagen para perforar la zona pelúcida (olympus4art.com).

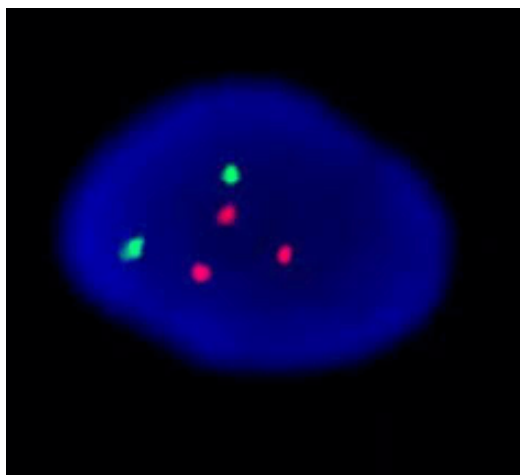
Cabe mencionar que en los últimos años han ido surgiendo nuevas maneras de realizar análisis genéticos sin poner en peligro la integridad del embrión. Estos métodos consisten en el uso del ADN liberado por el embrión en un cultivo dado, aunque aún son necesarios muchos estudios para evitar la contaminación maternal y poder amplificar sólo el material genético del embrión, puede ser una alternativa a las técnicas invasivas (Rubio *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2019).

### **1.5.2 Técnicas DGP**

El avance del DGP a lo largo de la historia se vio impulsado por la aparición de la PCR y del FISH (Munné *et al.*, 1993a) gracias a su gran sensibilidad y especificidad en el análisis de biopsias de blastómeros. El FISH consiste en una sonda de ADN marcado, usando nucleótidos fluorescentes o indirectamente, añadiendo moléculas indicadoras que son detectadas por anticuerpos fluorescentes u otras moléculas de afinidad (*Figura 8*) (Ratan *et al.*, 2017; Kanavakis y Traeger-Synodinos, 2002). Esta sonda se hibrida específicamente a una región o cromosoma concreto, de manera que se puede identificar utilizando un microscopio de fluorescencia. Sin embargo, esta técnica ha quedado obsoleta debido a su limitación en el número de cromosomas que puede analizar a la vez, su incapacidad de detectar mutaciones puntuales, contaminación materna y la posible aparición de falsos positivos o falsos negativos.

La PCR consiste en la amplificación de una región de ADN en concreto, en el caso del DGP, del gen mutado. Se usa para la identificación de desequilibrios cromosómicos (Fiorentino *et al.*, 2010), mutaciones simples (Handyside *et al.*, 1990; Dreesen *et al.*, 2013) y compatibilidad de HLA.

Estas dos técnicas mencionadas, fueron aplicadas satisfactoriamente (Grifo *et al* 1990) en los primeros años del DGP para el estudio de enfermedades ligadas al cromosoma X con embarazo llegado a término en todos los casos (Handyside 1990).



**Fig. 8. Técnica FISH.** Ejemplo en el que se observa la sonda que ha hibridado en los cromosomas 13 (verde) y 21 (rojo), observando claramente 3 sondas rojas, lo que demuestra una trisomía en el cromosoma 21 o síndrome de Down (<https://ibquaes.com/>).

Posteriormente, han aparecido técnicas más novedosas, especialmente para PGT-A. La primera de ellas fue el microarray de hibridación genómica comparativa (CGH, del inglés *comparative genomic hybridization*), que consiste en la hibridación del ADN de una célula a evaluar con el contenido de ADN de un control normal. Muestra y control se amplifican mediante PCR isoterma y se marcan con fluoróforos distintos. Posteriormente, se hibridan en conjunto a un microarray que contiene miles de sondas para todos los cromosomas. Finalmente, mediante un escáner podremos identificar dónde se ha producido la hibridación y su fluorescencia nos permitirá discernir si ha habido pérdidas o ganancias de material genético. La ventaja de esta técnica es que, no es necesario seleccionar los cromosomas a estudiar, se evalúa la totalidad del material genético, a diferencia del FISH donde se analizan ciertos cromosomas. Tiene más resolución y velocidad que la CGH más convencional y se ha adaptado al DGP (Hellani *et al.*, 2008).

En los últimos 4 o 5 años, otras técnicas se han utilizado para DGP, como la secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*), técnica que permite analizar cientos de mega bases de forma más rápida y precisa. Hoy en día, las tecnologías *Illumina* y *Thermo Fisher* son las técnicas de secuenciación más utilizadas debido a su efectividad a un precio razonable.

## 1.6 niPGT-A

Como ya se ha explicado anteriormente, el DGP o PGT, requiere de técnicas invasivas para obtener el ADN del embrión generado por FIV o ICSI para así realizar el estudio genético. La técnica menos usada hoy en día es la biopsia de corpúsculo polar, debido a

que es muy cara e implica la biopsia de un gran número de ovocitos, pero de los cuales muchos no serán fertilizados o no llegarán al estado de blastocisto (Cimadomo *et al.*, 2016). Además, requiere del análisis de dos corpúsculos polares por cada ovocito, y está asociada con un riesgo elevado de diagnóstico erróneo debido a la alta incidencia de anomalías cromosómicas post-meióticas (McCoy, 2017), y a que sólo se tiene información del genoma materno. Por lo tanto, esta técnica ha quedado obsoleta, pese a que se propuso como alternativa a la biopsia embrionaria para testear las aneuploidías, y sólo se realiza en aquellos países donde está prohibida la biopsia embrionaria.

Las biopsias de blastómero y de células del trofoectodermo también tienen sus inconvenientes. De hecho, hay estudios que sugieren que la biopsia de un blastómero puede privar al embrión de un correcto desarrollo (Zacchini *et al.*, 2017), si bien es un punto que no está claramente demostrado.

En primer lugar, la biopsia embrionaria solo puede llevarse a cabo en cierto punto del desarrollo del embrión: en día 4 o día 5-6. En embriones de día 3 con menos de 6 blastómeros no se puede remover ninguna ya que podría afectar al desarrollo del embrión (Harton *et al.*, 2011; Milachich, 2014). Por tanto, hay que esperar a que en día 3 tenga 6-8 células.

De manera análoga, al realizar una biopsia de trofoectodermo en día 5 o día 6, el número de células biopsiadas, puede afectar negativamente al potencial implantatorio de aquellos blastocistos con una calidad de células del trofoectodermo baja (Zhang *et al.*, 2016). Además, en blastocistos tempranos no se puede biopsiar ya que se puede aspirar involuntariamente células de la MCI debido a su proximidad con el TE (Milachich, 2014).

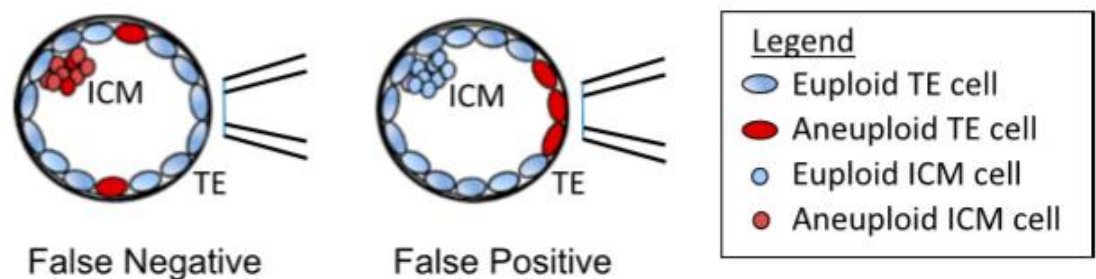
En segundo lugar, debido al mosaicismo, se pueden dar errores en el diagnóstico dando lugar a falsos positivos o falsos negativos (McCoy, 2017). Como ya se ha mencionado, cuando se realiza la biopsia de una única célula en día 3, no se puede garantizar que esa célula sea representativa de todo el embrión. Algo similar sucede cuando se realiza la biopsia de trofoectodermo, con la diferencia de que en estos casos a veces es posible detectar ese mosaicismo en la propia biopsia, lo que dificulta el diagnóstico y el consejo genético de la pareja.

La interpretación del diagnóstico genético preimplantacional está basada en distintos supuestos. El primero es que las células euploides y aneuploides se distribuyen de forma aleatoria en el trofoblasto. El segundo, que la incidencia de células aneuploides en el trofoblasto es extrapolable a la MCI.

Debido al mosaicismo, se pueden formar células euploides y aneuploides en el trofoblasto. Por lo tanto, puede darse la situación en la que en una biopsia se extraigan sólo las células aneuploides pese a que el resto sean células normales, dando lugar a falsos positivos, pudiendo catalogar como no apto un embrión sano (*Figura 9*).















Además, la frecuencia de aneuploidías en el trofoblasto es mucho mayor que en la MCI, por lo que puede no ser informativo.

Del mismo modo, puede darse la situación en la que se extraigan células euploides pese a que algunas sean aneuploides, dando lugar a falsos negativos, implantando un embrión anormal (*Figura 9*).



**Fig. 9. Representación gráfica del falso negativo y falso positivo.** A la izquierda observamos como podría darse un falso negativo, extrayendo células euploides pese a que las células de la MCI sean aneuploides. A la derecha se ve como se daría un falso positivo, extrayendo células aneuploides pese a que el embrión sea euploide (Huang *et al.*, 2019). TE cell: del inglés trophoctoderm cell, célula del trofoectodermo. MCI cell: del inglés inner celular mass cell, célula de la masa celular interna.

Un embrión mosaico es aquel embrión el cual ha sufrido una serie de errores mitóticos durante el desarrollo, lo que da lugar a distintas poblaciones celulares. El mosaicismo afecta al 30-40% de los blastocistos humanos (Fragouli *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2019). En este estado de blastocisto podemos encontrar distintos tipos de embriones mosaico dependiendo del linaje celular afectado. Un embrión con mosaicismo completo ocurre cuando se encuentran células aneuploides y euploides tanto en la MCI como en el TE. De igual manera, podemos encontrar mosaicismo de la MCI y mosaicismo del TE cuando algunas células de cada parte son aneuploides. Finalmente, encontramos el mosaicismo MCI/TE tipo 1, en el que encontramos todas las células del MCI aneuploides. Y el mosaicismo MCI/TE tipo 2, en el que todas las células del TE son aneuploides (*Figura 10*).

Mosaicism type	Possible TE biopsy	Diagnoses accuracy
<b>Total Mosaic</b> 	 Euploid	Misdiagnosis
	 Mosaic	Accurate
	 Aneuploid	Misdiagnosis
<b>ICM Mosaic</b> 	 Euploid	Misdiagnosis (Mosaicism never detectable)
<b>TE Mosaic</b> 	 Euploid	Misdiagnosis
	 Mosaic	Accurate
	 Aneuploid	Misdiagnosis
<b>ICM/TE Mosaic Type I</b> 	 Euploid	Misdiagnosis (Mosaicism never detectable)
<b>ICM/TE Mosaic Type II</b> 	 Aneuploid	Misdiagnosis (Mosaicism never detectable)

**Fig. 10. Figura que representa la clasificación de los distintos tipos de mosaicismo.** El mosaicismo puede afectar al TE (estructura que da lugar a la placenta) o al MCI (estructura que da lugar al feto). Un mosaico total es un embrión con células aneuploides tanto en el TE como en la MCI, en este caso se va a dar un diagnóstico erróneo. Un mosaico de MCI afecta a las células de la MCI, en este caso no se va a detectar el mosaicismo debido a que las células del TE son euploides, diagnóstico erróneo. El mosaico de TE, es similar al mosaico total, pero con un embrión totalmente sano. Por último, existe el mosaico MCI/TE de tipo 1, en el cual todas las células de la MCI son aneuploides, aunque en la biopsia se van a extraer las células euploides del TE, dando lugar a un diagnóstico erróneo asegurado ya que es imposible detectar el mosaicismo. Y el mosaico MCI/TE tipo 2, en el cual todas las células del TE son aneuploides mientras que las de la MCI son euploides, desechándose un embrión sano (Vera-Rodriguez y Rubio., 2017).

En tercer lugar, es bien sabido que los procedimientos invasivos pueden reducir el potencial reproductivo del embrión (Brouillet *et al.*, 2020). La biopsia de blastómero podría provocar un desarrollo embrionario subóptimo (Munné *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2013) lo que puede tener ciertas consecuencias en el nacimiento como efectos perjudiciales en neonatos y niños (Middelsburg *et al.*, 2010). Similarmente, no hay seguridad en cuanto a la certeza de la biopsia de TE ya que requiere del cultivo in-vitro hasta el estado de blastocisto, lo que implica una dificultad añadida al proceso. Mientras que hay estudios que sugieren que no existe ningún cambio en el potencial de

implantación con o sin biopsia de TE (Scott Jr *et al.*, 2013). El único artículo que estudia la seguridad clínica de la biopsia de TE, concluye que la transferencia del embrión tras una biopsia de TE disminuye la tasa de aborto espontáneo (Forman *et al.*, 2012). Sin embargo, la población analizada es muy pequeña, por lo que no son resultados del todo informativos (Huang *et al.*, 2019). Un estudio sobre el impacto de la biopsia de TE con un gran muestreo es necesario para analizar la seguridad de esta.

En cuarto y último lugar, estos procedimientos invasivos son caros y necesitan mucho tiempo, además, requieren de grandes habilidades técnicas, material adecuado y práctica constante (Milachich, 2014). Por todo esto, se necesitan métodos alternativos al PGT que minimicen el impacto sobre el embrión y faciliten el diagnóstico genético.

El principal candidato para sustituir a estas técnicas en un futuro es el niPGT-A (del inglés, *non-invasive Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies*). Gracias a la capacidad de detectar ADN libre (cfDNA; del inglés, *cell-free DNA*) se han abierto múltiples perspectivas para realizar diagnósticos en medicina reproductiva (Lo *et al.*, 1997; Assou *et al.*, 2014). Se ha detectado cfDNA en medio de cultivo (SCM) (Stigliani *et al.*, 2013), y en el líquido blastocélico (BF; del inglés *blastocoel fluid*) (Palini *et al.*, 2013). Aunque esta última no puede ser considerada como no invasiva sino mínimamente invasiva, debido a que, para aspirar el líquido hay que perforar la capa del TE mediante blastocentesis o mediante laser para que el fluido salga al medio de cultivo. Además, debe llevarse a cabo con blastocistos expandidos, es decir, en estado de desarrollo 3. Por lo que los blastocistos en estado 1 o 2 no son apropiados para realizar este proceso (*Figura 11*) (Palini *et al.*, 2013). Pese a su condición de mínimamente invasiva, se ha detectado cantidades grandes de cfDNA, aunque con una concordancia en los resultados de ploidías muy amplios (48-97%) (Magli *et al.*, 2019).

Por lo tanto, el cfDNA proveniente de un medio de cultivo puede ser la mejor opción para llevar a cabo el niPGT frente al fluido blastocélico. La detección tanto del ADN nuclear (nDNA; del inglés, *nuclear deoxyribonucleic acid*) como del ADN mitocondrial (mDNA; del inglés, *mitochondrial deoxyribonucleic acid*) en procesos de reproducción asistida, abre nuevas puertas para el uso de técnicas no invasivas y la mejora del PGT convencional.

	Grade	Rating	Description
Stage of development	1		Early
	2		Blastocyst
	3		Expanded
	4		Hatched/hatching
ICM	1	Good	Prominent, easily discernible, with many cells that are compacted and tightly adhered together
	2	Fair	Easily discernible, with many cells that are loosely grouped together
	3	Poor	Difficult to discern, with few cells
TE	1	Good	Many cells forming a cohesive epithelium
	2	Fair	Few cells forming a loose epithelium
	3	Poor	Very few cells

**Fig. 11. Sistema de puntuación para los blastocistos.** Es una combinación del estado de desarrollo (del 1 al 4), siendo el 1 el estado más temprano, y el 4 el previo a la eclosión. El grado de MCI (del 1 al 3) y el grado de TE (del 1 al 3), siendo en ambos casos el 1 el grado bueno, y el 3 el estado pobre debido al pequeño número de células existente (Gardner y Schoolcraft, 1999).



## 2. ANTECEDENTES

Como ya se ha mencionado anteriormente, la gran destreza y experimentación necesaria para llevar a cabo las técnicas de biopsia en el DGP, junto al gran coste que implica el equipamiento para el proceso, acarrea un gran número de limitaciones, lo que disminuye la accesibilidad de sus ventajas a gran parte de la población debido a su alto coste.

El gasto que afronta una pareja para realizar un DGP puede superar los 3000€ adicionales al FIV. Llegando a costar el tratamiento de FIV+DGP alrededor de los 8000€ dependiendo del tipo de análisis y/o el número de embriones a estudiar.

Por ello, varios grupos de investigación en el ámbito de la medicina reproductiva se han dedicado a investigar nuevas estrategias con el fin de disminuir las limitaciones de las técnicas invasivas. El análisis del cfDNA liberado en el SCM tras el FIV se ha postulado como uno de los posibles futuros del PGT (Leaver y Wells, 2019; Cimadomo *et al.*, 2020).

Aunque se ha hecho menos hincapié en el diagnóstico de enfermedades monogénicas mediante el análisis de cfDNA, puede tener un futuro, no obstante, son necesarios más estudios para demostrar su aplicabilidad clínica (Assou *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015) ya que hay estudios que recomiendan no usar el análisis del ADN del SCM para PGT-M (Capalbo *et al.*, 2018).

Los primeros artículos publicados sobre el uso de técnicas no invasivas para el cribado de cromosomas fueron publicados en 2016 (Xu *et al.*, 2016; Shamonki *et al.*, 2016) quienes realizaron el estudio gracias a la demostración del potencial del ADN liberado por el embrión en el SCM en varios estudios anteriores (Assou *et al.*, 2014; Galluzzi *et al.*, 2015).

A raíz de estos alentadores resultados, varios grupos compararon los resultados obtenidos por PGT de biopsia de TE convencional con los resultados del análisis de cfDNA del SCM, reportando tasas de amplificación del ADN entre 80 y 100%, aunque con una mayor variabilidad en cuanto a la concordancia con los resultados (Vera-Rodriguez *et al.*, 2018; Ho *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019; Rubio *et al.*, 2019).

Así bien, es necesaria una mejora en la precisión y fiabilidad del proceso no invasivo mediante la búsqueda de estrategias que permitan un aumento de la cantidad de cfDNA en el medio de cultivo y reducir la contaminación ya sea materna o exógena, mejorando

la sensibilidad en la detección del cfDNA sin reducir la especificidad (Hammond *et al.*,2016; Hammond *et al.*,2017).

En 2017, Feichtinger y sus compañeros propusieron nuevos métodos para países como Austria, los cuales, por ley, no pueden realizar biopsias embrionarias. Nombraron la posibilidad de usar el niPGT como alternativa adicional a la información obtenida de la biopsia de corpúsculo polar, debido a que esta última técnica solo ofrece información de las alteraciones cromosómicas presentes en los ovocitos (Feichtinger *et al.*,2017).

Ante la falta de concordancia total entre los resultados de la biopsia de trofotodermo y el medio de cultivo, algunos investigadores han valorado la idea de usar el niPGT como fuente de información adicional a los resultados del PGT convencional, pudiendo ser una alternativa de valor. Según proponen, se obtendrían mejores resultados si se seleccionase un embrión sano si se reportase como euploide tanto en el PGT obtenido de la biopsia de TE como en el niPGT-A. Sin embargo, si se selecciona un embrión como normal por reportarse como euploide en un análisis de PGT convencional, pese a que en el niPGT-A se reporte como aneuploide, puede dar lugar a diagnósticos erróneos. Tal posibilidad ha sido evaluada clínicamente por Carmen Rubio con resultados positivos (Rubio *et al.*,2019).

Más tarde, varios grupos de estudio establecieron protocolos en los que consiguieron la contracción artificial del blastocisto en el medio de cultivo mediante “*hatching* asistido”, que consiste en la apertura de un orificio en la zona pelúcida, permitiendo el análisis de una combinación de BF y ADN del SCM (Kuznyetsov *et al.*,2018; Li *et al.*,2018; Jiao *et al.*,2019). Los resultados de estos estudios fueron comparados con la información de biopsia de TE, obteniendo resultados muy prometedores.

Por consiguiente, la combinación en el análisis de BF y de SCM, representa una perspectiva con mucho futuro. Sin embargo, la obtención del BF necesita de una micro manipulación para aspirar el fluido, por lo que no se puede considerar una técnica no invasiva, sino más bien mínimamente invasiva (Cimadomo *et al.*,2020).

No obstante, el análisis del cfDNA puede ser suficiente por sí mismo, pero es necesaria una validación, estandarización y mejora de la fiabilidad del proceso para implantarlo como alternativa real a los métodos invasivos.

Carmen Rubio, la directora de investigación genética embrionaria en Igenomix, es y ha sido una de las investigadoras más importantes en el ámbito de las nuevas técnicas no invasivas y la que mejor está posicionando esta técnica. En 2019, estableció un nuevo protocolo que restringía la intervención de los técnicos de las clínicas de FIV al simple

hecho de cambiar el medio a un tubo limpio de 10 µl en el día 4 tras la inseminación. Gracias a este protocolo, en el que el embrión se cultivaba al menos 48 horas, se consiguieron unas tasas de amplificación de un 94.8% y una concordancia en la ploidía y el sexo de un 84% (Rubio *et al.*, 2019).

Por esa razón, Igenomix ha desarrollado una técnica no invasiva tras realizar el estudio más grande hasta la fecha, analizando 1300 medios de cultivo de embriones los cuales fueron biopsiados en distintos centros de reproducción asistida alrededor del mundo.

Se han analizado todos los medios de cultivo de embriones en día 6, debido a que el análisis en su fase más tardía del desarrollo permite optimizar los resultados debido al gran número de células y, por consiguiente, mayor cantidad de ADN liberada al medio de cultivo.

Este último estudio, ha resultado en un 78% de concordancia entre el PGT-A convencional y el niPGT-A. Y un 84 % de concordancia en el análisis de la MCI de 81 embriones aneuploides.

Además, el análisis mediante NGS se ha realizado con un protocolo y un algoritmo nuevo, desarrollado específicamente para el análisis de cfDNA.

Por último, como ya se sugirió para el BF (Capalbo *et al.*, 2016), el cfDNA del SCM puede ser aplicado para los análisis “ómicos” con el fin de obtener información molecular adicional que mejore la calidad de selección embrionaria (Cimadomo *et al.*, 2019; Giacomini *et al.*, 2017; Siristatidis *et al.*, 2018).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

- Revisar y describir el estado actual e histórico del diagnóstico genético preimplantacional (DGP), comentando todas sus aplicaciones y técnicas empleadas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Identificar los problemas y limitaciones que implican las técnicas invasivas en el diagnóstico de anomalías genéticas.
- Demostrar la especificidad y sensibilidad del análisis del cfDNA expulsado al medio de cultivo para el análisis de alteraciones genéticas, especialmente, de aneuploidías.
- Exponer los resultados alentadores obtenidos en el uso del niPGT-A en comparación con las técnicas de biopsia convencionales, principalmente, comparando los resultados con los obtenidos tras la biopsia de TE.
- Discutir la comercialización de los métodos no invasivos y si son una alternativa real al DGP convencional.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

El plan de trabajo seguido está representado en el cronograma (*Tabla 3*), el cual muestra la disposición temporal del trabajo fin de grado, desde la asignación del trabajo en febrero, hasta la entrega del trabajo en julio.

Para la realización del trabajo, fue primordial analizar e investigar en la bibliografía acerca del DGP y sus técnicas. La bibliografía se buscó principalmente en la base de datos *PUBMED*, y en algunos casos en *ScienceDirect*. Las palabras clave usadas para la redacción de la introducción, en la que se contextualiza el diagnóstico genético preimplantacional, fueron: “*Preimplantation genetic diagnosis*” y “*Trophectoderm biopsy*”. Se encontraron 5096 artículos en *PubMed*, se aplicó el marcador “*review*”, obteniendo así 1146 artículos, de los que se usaron para redactar la introducción la información de alrededor de 80 artículos.

Para el desarrollo de los nuevos métodos no invasivos, concretamente, el niPGT-A, se usaron las siguientes palabras clave: “*non-invasive PGT-A*”, “*cfDNA*” y “*spent embryo culture medium*”. Se añadió el operador booleano “Y” obteniendo 19 artículos que fueron usados para extraer información sobre la nueva metodología no invasiva. Los operadores booleanos (Y, OR, NOT) son usados como nexos entre los términos para su búsqueda conjunta.

**Tabla 3. Cronograma.**

		FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO				JULIO			
		S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
ASIGNACIÓN DEL TRABAJO																									
BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA																									
TUTORIAS																									
PLANIFICACIÓN																									
REDACCIÓN	RESUMEN																								
	INTRODUCCIÓN																								
	OBJETIVOS																								
	RESULTADOS																								
	DISCUSIÓN																								
	CONCLUSIÓN																								
REVISIÓN																									
ENTREGA																									
DEFENSA																									

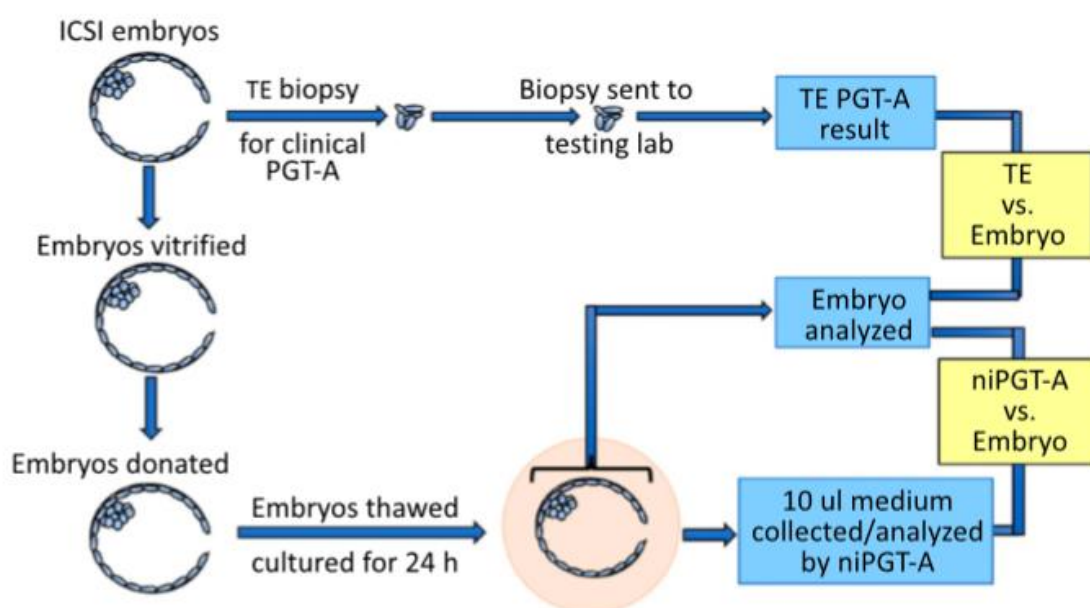
Por último, para la parte de los resultados y la discusión se usaron los artículos más recientes sobre el niPGT-A, los cuales analizaban todos los resultados comparándolos con las técnicas invasivas. En total 17 artículos fueron usados para la redacción de los resultados. Se hizo más hincapié en los estudios del grupo de trabajo de Igenomix (VeraRodriguez *et al.*, 2018; Rubio *et al.*, 2019; Rubio *et al.*, 2020) además de los estudios con mejores resultados (Xu *et al.*, 2016; Kuznyetsov *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019).

## 5. RESULTADOS

El *modus operandi* de la mayoría de los estudios que se han realizado con el fin de analizar la fiabilidad de los nuevos métodos no invasivos para el PGT son parecidos, comparar los resultados obtenidos del análisis del cfDNA con los obtenidos tras una biopsia embrionaria, sobre todo, tras una biopsia de TE (*Figura 12*).

Por lo tanto, en todos los estudios se usan embriones que han sido fecundados mediante FIV/ICSI en clínicas de reproducción asistida, los cuales han sido analizados previamente con los métodos tradicionales de PGT. Estos embriones se vitrifican y son donados para ser cultivados y proceder al análisis del SCM.

En el 87% de estudios, los embriones analizados se obtuvieron previamente por ICSI (Xu *et al.*, 2016; Feichtinger *et al.*, 2017; Vera-Rodriguez *et al.*, 2018). En cuanto al análisis del cfDNA, hay estudios que analizan el cfDNA del SCM por sí solo, y otros que analizan también el BF (Li *et al.*, 2018). No obstante, algunos estudios han concluido que el BF no aumenta la tasa de detección del cfDNA en muestras de SCM y BF (Li *et al.*, 2018).



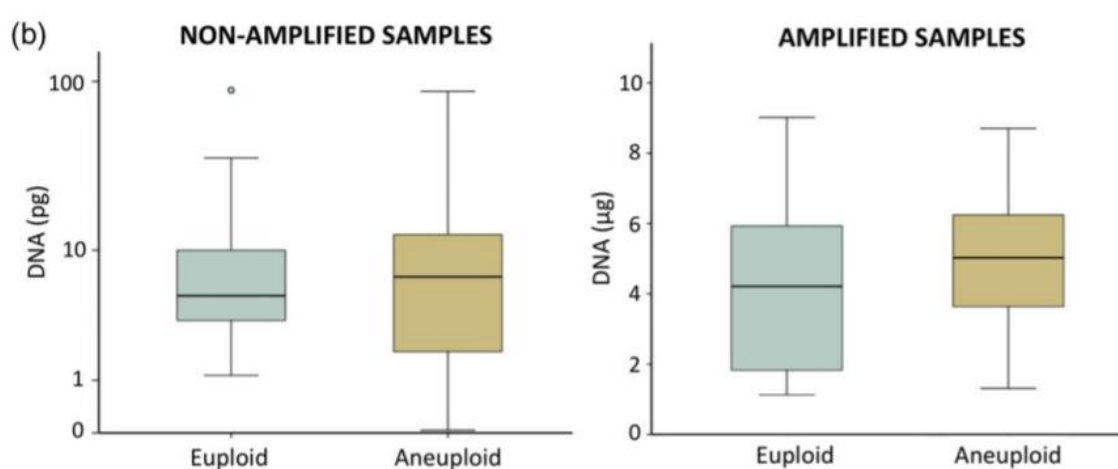
**Fig. 12. Modus operandi de un estudio con el fin de analizar la viabilidad del niPGT-A.** Representación gráfica en la que se ve como los embriones sometidos a una biopsia de TE son vitrificados y donados. Estos, tras ser cultivados durante 24 horas se extraen 10 µl del medio para analizar. Se comparan los resultados del medio con la referencia del embrión entero y los resultados obtenidos de la biopsia de TE (Huang *et al.*, 2019).

El análisis del cfDNA puede realizarse en distintas etapas de desarrollo embrionario, siendo la más usada en la etapa de blastocisto (día 5-día 6) (Kuznyetsov *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Vera-Rodriguez *et al.*, 2018). No obstante, también hay estudios de cfDNA

obtenido del embrión en estado de cigoto (día 1) (Yang *et al.*, 2017); etapa de embrión escindido (día 2-3) (Assou *et al.*, 2014) o de embrión en etapa de mórula (día 4) (Yang *et al.*, 2017).

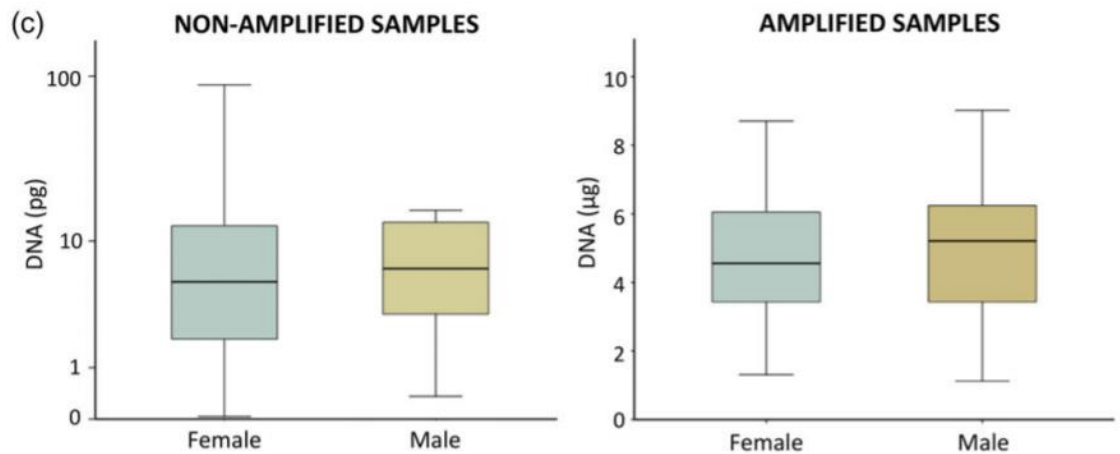
Asimismo, se ha demostrado que la liberación del cfDNA al medio de cultivo no está influida ni por la vitrificación del embrión (Kuznyetsov *et al.*, 2018), ni la ploidía del embrión, ni el sexo del embrión (Vera-Rodriguez *et al.*, 2018).

Además, surgió la pregunta de si había diferencia en cuanto a la concentración de ADN de un embrión siendo euploide o aneuploide, y se demostró que no (Vera-Rodriguez *et al.*, 2018) (*Figura 13*). Este hallazgo fue importante debido a que, hasta la fecha, una de las teorías sobre el origen del cfDNA defendía que se trataba de células apoptóticas que el embrión “eliminaba”. Por lo que el mecanismo de “self-correction” que explicaba que las células aneuploides sufrían apoptosis para “limpiar” el embrión quedó en un segundo plano al ver que liberaban la misma cantidad de ADN euploides y aneuploides. También se analizó si existía diferencia en la concentración de ADN según el sexo del embrión, comprobándose que no influía en la liberación del ADN (*Figura 14*).



**Fig. 13.** Gráfica de cajas que muestra la media de concentración de ADN (pg) en muestras sin amplificar (izquierda) y muestras amplificadas (derecha) según la ploidía del embrión. Tanto en la izquierda como en la derecha se ven resultados similares, por lo que no se puede decir que existan diferencias significativas en la concentración de ADN siendo el embrión euploide o aneuploide (Vera-Rodríguez *et al.*, 2018).





**Fig. 14. Gráfica de cajas que muestra la media de concentración de ADN (pg) en muestras sin amplificar (izquierda) y muestras amplificadas (derecha) según el sexo del embrión.** Se puede observar tanto en la gráfica de la izquierda como en la de la derecha valores muy similares en la concentración de ADN, por lo que no existen diferencias significativas (Vera-Rodríguez *et al.*, 2018).

Para la evaluación de la fiabilidad del niPGT-A, el análisis genético del ADN se realiza en su gran mayoría (60%) por NGS, y en algunos casos con aCGH o qPCR (Brouillet *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos, se compararon con las técnicas invasivas, como la biopsia de corpúsculo polar (Feichtinger *et al.*, 2017), biopsia de blastómeros o de TE (Shamonki *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Capalbo *et al.*, 2018; Ho *et al.*, 2018; Kuznyetsov *et al.*, 2018; Vera-Rodríguez *et al.*, 2018) e incluso con el análisis completo del embrión (Li *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019). Debido al mosaicismo, el análisis del embrión entero es muy recomendable para evaluar la fiabilidad del niPGT, en consecuencia, un gran porcentaje de estudios usaron el análisis del embrión como ADN de referencia (Xu *et al.*, 2016; Ho *et al.*, 2018; Kuznyetsov *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos se representaron mediante la tasa de concordancia entre las distintas técnicas. En el caso de Feichtinger, el único estudio que comparó resultados del niPGT con resultados de biopsias de corpúsculo polar, se obtuvo una tasa de concordancia de un 72,2% (Feichtinger *et al.*, 2017).

En cuanto a la concordancia de los resultados del niPGT-A y la biopsia convencional de TE, han variado bastante a lo largo de los años con las mejoras de la técnica, obteniendo resultados de un 3,5% (Shamonki *et al.*, 2016), 30% (Vera-Rodríguez *et al.*, 2018), 50% (Galluzi *et al.*, 2015), 65% (Ho *et al.*, 2018), 72,2% (Feichtinger *et al.*, 2017) hasta un 84% (Rubio *et al.*, 2019), incluso un 85,7% con vitrificación previa lo que puede aumentar la expulsión del cfDNA al medio. Además, en la combinación del cfDNA con el BF se ha obtenido una tasa de correlación de un 100% (Kuznyetsov *et al.*, 2018) (Tabla 4).

**Tabla 4. Tabla que muestra los estudios más relevantes, sus características y resultados en porcentaje de concordancia.**

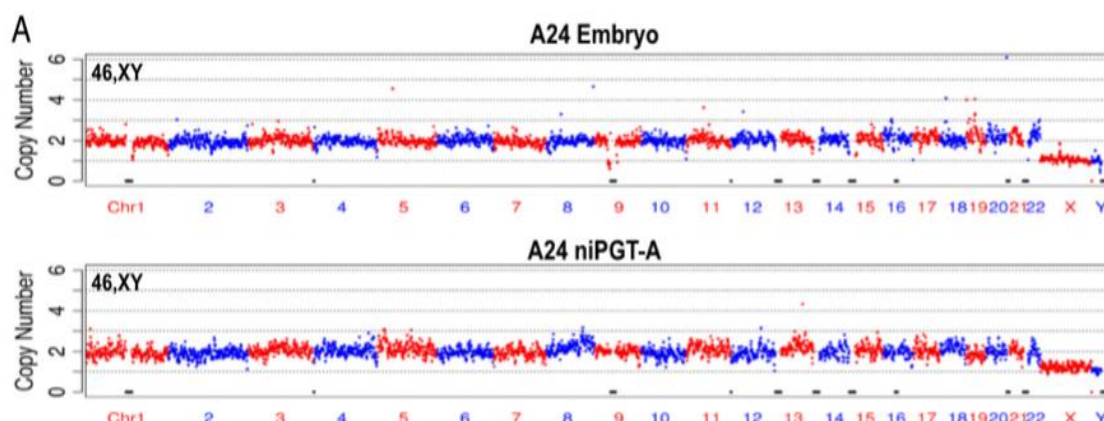
	Nº Muestras	Biopsia previa	Assisted Hatching	Vitrificación	BF+SBM	% concordancia	% whole blastocyst
(Shamonki et al., 2016)	55	-	Sí (Día 3)	-	-	<b>3,50%</b>	-
(Feichtinger et al., 2017)	22	-	Sí (Día 1)	-	-	<b>27%</b>	-
(Ho et al., 2018)	61	-	Sí	-	-	<b>65%</b>	
(Xu et al., 2016)	42	-	Sí (Día 3)	Sí	-	<b>85,70%</b>	-
(Yeung et al., 2019)	167	-	Sí (Día 3)	Sí	-	<b>62,10%</b>	-
(Huang et al., 2019)	52	Sí	-	Sí	-	<b>82%</b>	93,80%
(Kuznyetsov et al., 2018)	47	-	-	-	Sí	<b>87,50%</b>	96,40%
(Jiao et al., 2019)	62	-	-	Sí	Sí	<b>75%</b>	96,80%

Por último, la tasa de concordancia entre los resultados de niPGT-A y la referencia del análisis del embrión entero, varía entre un 65% (Ho et al., 2018) y un 100% (Xu et al., 2016).

Uno de los estudios que mejor ha demostrado la fiabilidad del niPGT para el análisis de aneuploidías en comparación con la biopsia de TE, es el realizado por Huang y sus compañeros. Se analizaron 52 embriones provenientes de madres de una edad media de 36 años. El objetivo era comparar los perfiles de CN (del inglés *copy number*) obtenidos del análisis del cfDNA con los obtenidos previamente tras la biopsia de células del TE. De 52 embriones analizados por niPGT-A se obtuvieron 48 perfiles interpretables, los 4 restantes dieron perfiles con mucho ruido, por lo que se catalogaron como no interpretables. Las muestras usadas como blanco cumplieron su función y no se detectó ADN en ninguna de las 5 muestras.

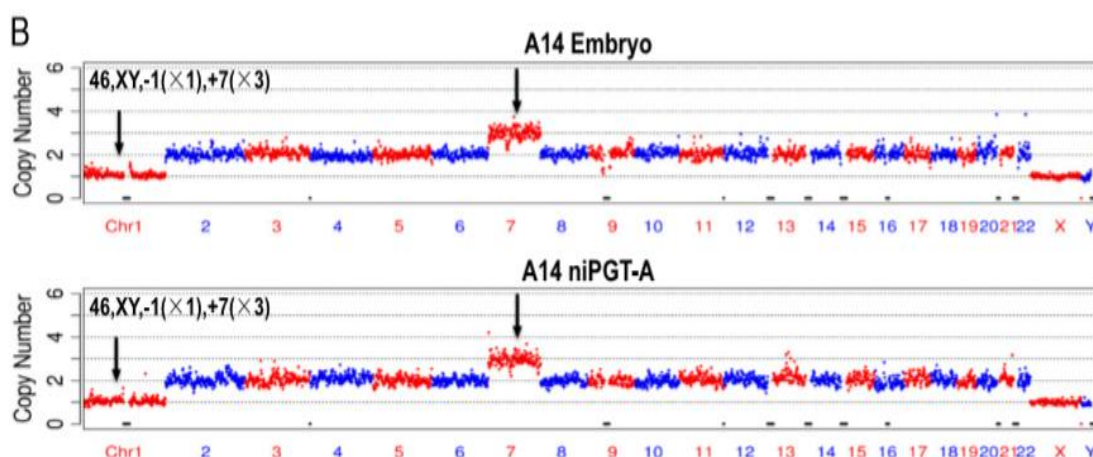
Los primeros resultados demostraron que el niPGT-A es capaz de identificar embriones euploides. Como se observa en la *Figura 15*, en el embrión A24 se ve un perfil euploide con dos CNs en todos los autosomas y un CN en los cromosomas sexuales. Por

lo tanto, estos resultados sugieren que el ADN detectado en el medio proviene principalmente de la apoptosis de células euploides (Huang *et al.*, 2019).



**Fig. 15. Perfiles embrión A24.** Se observan dos perfiles correspondientes al embrión A24, en el eje vertical observamos el número de copias (CN) y en el eje horizontal los 22 cromosomas autosómicos y los 2 cromosomas sexuales. El perfil de arriba es el usado como referencia (método invasivo) y el de abajo el obtenido tras el análisis del cfDNA del medio de cultivo (niPGT-A). En este caso ambos perfiles son euploides y varones (46, XY) (Huang *et al.*, 2019).

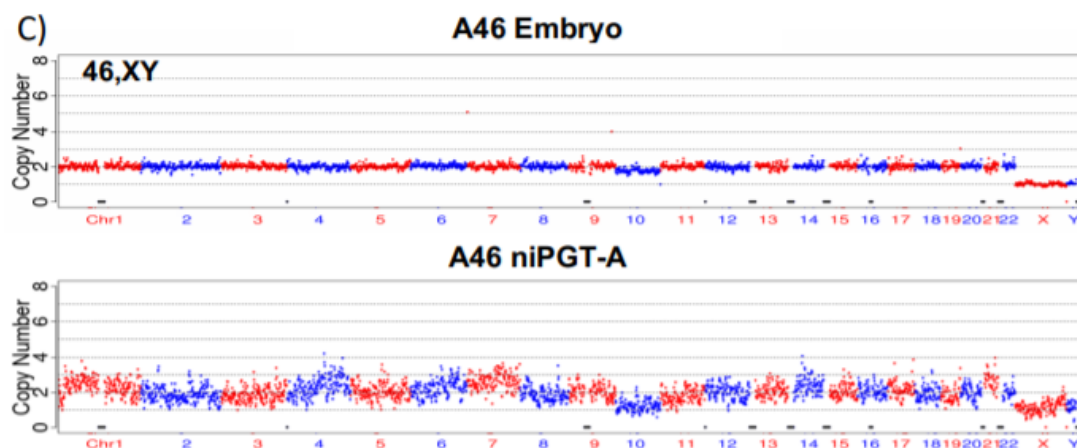
Asimismo, en el caso de embriones que presentan perfiles con algún cromosoma aneuploide, se obtienen resultados similares en los dos perfiles. Es el caso del embrión A14 (Figura 16), en el cual vemos una monosomía en el cromosoma 1 (CN=1) y una trisomía en el cromosoma número 7 (CN=3), y se observan ambas alteraciones en el perfil obtenido por niPGT-A. Por lo tanto, sugiere que la apoptosis de células aneuploides también puede ser identificada mediante el análisis del cfDNA del SCM.



**Fig. 16. Perfiles embrión A14.** Se observan dos perfiles correspondientes al embrión A14, en el eje vertical se ve el número de copias (CN) y en el eje horizontal los 22 cromosomas autosómicos y los 2 cromosomas sexuales. En este caso, tanto en el perfil de arriba como en el niPGT-A podemos observar varias alteraciones numéricas. 46, XY, -1, +7. En el cromosoma 1 solo hay una copia por lo que sufre una monosomía del cromosoma 1. En el cromosoma 7 ocurre algo distinto, hay una copia de más, habiendo un total de 3 copias, este suceso se denomina trisomía del cromosoma 7 (Huang *et al.*, 2019).

Además, viendo los resultados obtenidos en estos dos embriones (*Figura 15 y Figura 16*), el hecho de obtener un CN de 1 en el cromosoma Y sin ruido demuestra la ausencia de contaminación maternal procedente de las células del cúmulo, lo que significa un gran avance en la fiabilidad de la técnica.

Los grandes problemas a los que se enfrentaron en este estudio fueron el ruido en la amplificación y la carencia de apoptosis, lo que genera perfiles con múltiples ganancias y pérdidas, es decir, con un coeficiente de variación muy grande (CV). Esto es lo que ocurrió en las 4 muestras que dieron perfiles no interpretables, como en el caso del embrión A46 (*Figura 17*), en el que se observa como en el perfil de referencia el embrión es euploide, sin embargo, en el perfil obtenido por niPGT-A hay mucho ruido y no se puede identificar la CN debido a que tiene un CV de 0.31. Por lo tanto, se recomienda no usar aquellos perfiles con CVs > 0.19 para la identificación de embriones aneuploides.

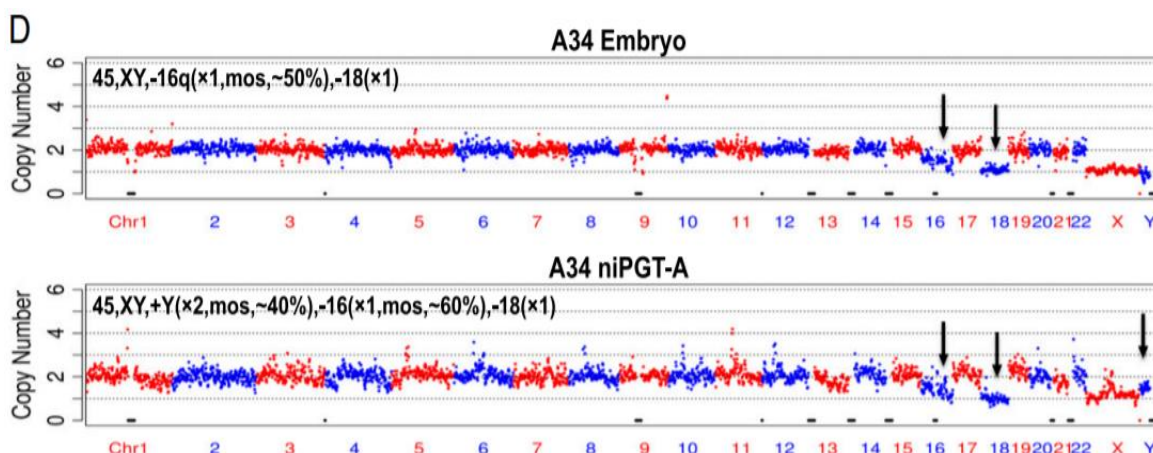


**Fig. 17. Perfiles embrión A46.** Se observan dos perfiles correspondientes al embrión A46, en el eje vertical observamos el número de copias (CN) y en el eje horizontal los 22 cromosomas autosómicos y los 2 cromosomas sexuales. En este caso, el perfil superior es totalmente euploide sin ninguna alteración. Sin embargo, el perfil obtenido por niPGT-A presenta un perfil caótico debido al ruido por una amplificación mala, con un coeficiente de variación de 0.31, muy por encima del valor máximo (0.19) establecido en el estudio (Huang et al., 2019).

A parte de la complicación que implica el ruido en la amplificación y la apoptosis celular insuficiente, el mosaicismo es una de las mayores complicaciones para la identificación de embriones euploides y aneuploides, surgiendo los denominados falsos positivos y falsos negativos.

Como ya se ha mencionado, el mosaicismo ocurre cuando hay células con distintos CNs en al menos un cromosoma.

En la *Figura 18* se muestra un ejemplo de un embrión mosaico con un CN no completo para el cromosoma 16 de 1.5 en el perfil de referencia, lo que significa que la mitad de la población celular estudiada en el cromosoma 16 es diploide, y la otra mitad haploide (*Figura 18*). En el perfil obtenido por niPGT-A, se ve un CN de 1.4, lo que significa que el 40% de la población celular sería diploide, y un 60% haploide. Además, muestra un CN de 1.4 para el cromosoma Y en el propio perfil de niPGT-A.



**Fig. 18. Perfiles embrión A46.** Se observan dos perfiles correspondientes al embrión A46, en el eje vertical observamos el número de copias (CN) y en el eje horizontal los 22 cromosomas autosómicos y los 2 cromosomas sexuales. En este caso representa un embrión mosaico, con diferentes poblaciones celulares. En el perfil superior, en el cromosoma 16 hay un CN no completo de 1.5 lo que significa que la mitad de las células son diploides y la otra mitad haploides (45, XY, -16q (50%)). Además, en el cromosoma 18 hay una monosomía. Por otro lado, en el perfil inferior aparece un resultado similar detectando correctamente la monosomía del cromosoma 18, y con un mosaicismo de 1.4 lo que significa que el 40% es diploide y el 60% haploide (45, XY, -16(60%)). Sin embargo, en este perfil aparece un mosaicismo del cromosoma Y que no aparece en el de referencia (+Y (40%)) (Huang et al., 2019).

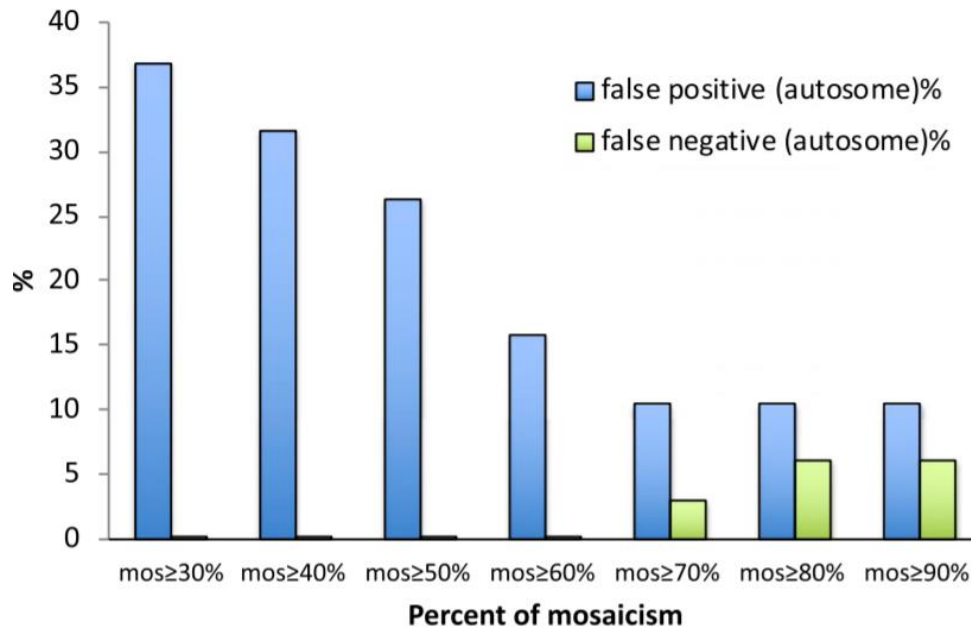
Debido a esta problemática, es necesaria la creación de un límite sobre el que se pueda identificar la aneuploidía pese al mosaicismo. Dependiendo del límite puesto, habrá más o menos FP y FN. Se trata de establecer unos límites superiores e inferiores en el nivel de mosaicismo, por debajo del cual el embrión es considerado normal y por encima alterado.

Huang et al., inicialmente estableció el límite en 30% para interpretar los perfiles. Tras el análisis estadístico, se demostró que estableciendo el límite en 30% no cabía la posibilidad de sufrir FN. Sin embargo, conforme aumentaba el porcentaje de limitación, disminuía la posibilidad de darse algún FP (*Figura 19*). Por lo tanto, la tasa de falsos positivos (FPR, del inglés *false positive rate*) mínima siendo la tasa de falsos negativos (FNR, del inglés *false negative rate*) cero ocurría en un límite de un 60% (*Figura 19*).

Por lo tanto, para interpretar como euploide un cromosoma, el CN debía estar entre 1.4 y 2.6. Si la  $CN < 1.4$  se interpretaría como una monosomía. En cambio, si la  $CN > 2.6$



se interpretaría como una trisomía. Para los embriones masculinos, en los cromosomas sexuales, la CN deberá estar entre 0.4 y 1.6 (Tabla 5).



**Fig. 19. Representación de los distintos niveles de limitación establecidos para minimizar los diagnósticos erróneos.** En la figura se observa una gráfica en la que el eje vertical representa el porcentaje de falsos positivos (azul) y falsos negativos (verde) para los distintos límites de porcentaje de mosaicismo. En el primer límite de 30% no hay falsos negativos pese a que el porcentaje de falsos positivos sea el más alto. La mejor opción es el límite de 60%, debido a que el porcentaje de falsos positivos es mínimo y el de falsos negativos sigue siendo 0 (Huang et al., 2019).

**Tabla 5. Interpretaciones de la CN de un cromosoma tras el límite de 60% establecido por Huang et al.**

Copy Number	
<b>Haploide</b>	<b><math>0.4 \leq CN \leq 1.6</math></b>
<b>Diploide</b>	<b><math>1.4 \leq CN \leq 2.6</math></b>
<b>Monosomía</b>	<b><math>CN \leq 1.4</math></b>
<b>Trisomía</b>	<b><math>CN \geq 2.6</math></b>

Se compararon los FPR y los FNR junto a la tasa de concordancia para niPGT-A y la biopsia de TE. Como era de esperar, la FNR fue de 0% para niPGT-A y para la biopsia de TE. Este resultado indica una mejora significativa en la eliminación de la contaminación materna.

En cuanto a la FPR, en los resultados del niPGT-A se obtuvo un 20%, mucho menos que el 50% obtenido de los datos de la biopsia de TE. Este resultado se dio debido a la gran proporción de embriones aneuploides donados, 41 embriones de 50 (82%), en comparación con la tasa de aneuploidía esperada de 35% (Franasiak et al., 2014).

Finalmente, se acabó usando el valor predictivo positivo (PPV, del inglés *Positive predictive value*) como indicador debido a su mayor fiabilidad. La PPV se calcula dividiendo los verdaderos positivos entre la suma de los falsos negativos y verdaderos positivos (Tabla 6). Los valores obtenidos fueron, para niPGT-A 91,7% y 78% para la biopsia de TE.

El valor predictivo negativo (NPV, del inglés *Negative predictive value*) fue de 100% tanto para el niPGT-A como para la biopsia de TE (Tabla 6).

Por último, la especificidad del niPGT-A y de la biopsia de TE fueron de 80% y 50%, respectivamente (Tabla 6).

**Tabla 6. Fórmulas aplicadas para obtener el valor predictivo positivo (PPV), el valor predictivo negativo (NPV) y la especificidad.**

$$\text{PPV} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos positivos}}$$

$$\text{NPV} = \frac{\text{Negativos verdaderos}}{\text{Negativos verdaderos} + \text{Falsos negativos}}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Negativos verdaderos}}{\text{Negativos verdaderos} + \text{Falsos positivos}}$$

Pese a estos resultados esperanzadores, era necesario un estudio con un muestreo mucho mayor para demostrar la fiabilidad de la técnica y su posible aplicabilidad clínica.

El mayor estudio realizado hasta la fecha ha sido publicado recientemente, en el mes de junio de 2020, por Carmen Rubio y su equipo perteneciente a Igenomix. En el artículo, se estudian 1301 embriones de 371 pacientes y 467 ciclos de PGT-A, provenientes de 8 de las clínicas de reproducción más punteras del mundo.

El 66,7% de los casos en los que se realizaron PGT-A fue por AMA (Rubio *et al.*, 2020). Se optó por elegir embriones en su mayoría (91,2%) biopsiados en día 6, estando la mayoría en estado de blastocisto expandido (grado 3) (Figura 11). Pese a que en otros estudios se haya concluido que los embriones transferidos en día 5 tenían un mejor pronóstico que los embriones transferidos en día 6 (Tannus *et al.*, 2019), se ha demostrado que un embrión en día 5 de buena calidad, mantiene su estado en día 6 tras un PGT-A.

La correlación entre el día de implantación del embrión y el resultado clínico fue demostrada en un análisis reciente que concluyó que el éxito de implantación y la calidad

del embarazo es mejor en casos de transferencia de día 5 que en casos de día 6. Sin embargo, al realizar un PGT-A, los resultados clínicos son similares en ambos casos (Bourdon *et al.*, 2019).

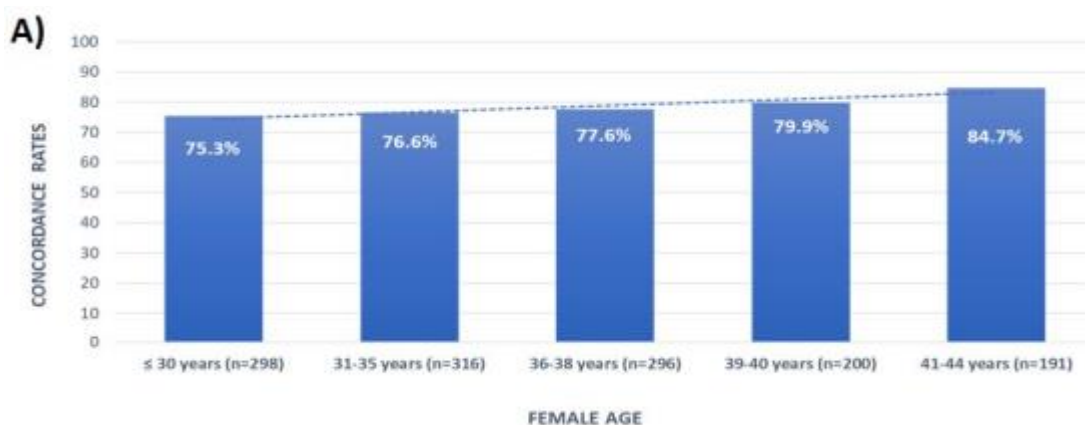
De los 1301 embriones analizados, un total de 34 embriones sufrieron una amplificación mala en las muestras de cfDNA (2,6%) y 14 de biopsias de TE (1,1%). Se obtuvieron resultados no informativos en 70 muestras de cfDNA (4,2%) y en 26 de biopsia de TE (2%). Además, se obtuvieron 55 perfiles caóticos con más de 5 aneuploidías que fueron considerados como no informativos. En total, 1108 embriones (85,2%) fueron aptos y dieron resultados analizables para cfDNA y biopsia de TE (Rubio *et al.*, 2020).

Las tasas de concordancia entre los resultados obtenidos en ambos métodos, fue de 78,2% (866/1108). Siendo mayor la concordancia en la detección de las anomalías cromosómicas o numéricas, 77,3% y 70,1%, para trisomías y monosomías respectivamente.

En cambio, para la detección de las anomalías estructurales, los resultados fueron muy bajos. Se detectaron duplicaciones y deleciones por encima de las 10 megabases, 52,2% y 10,3%, para las deleciones y las duplicaciones respectivamente.

Por lo tanto, según Rubio, en el sistema de priorización, los perfiles con duplicaciones irían antes en la lista de transferencia debido a su baja fiabilidad (Rubio *et al.*, 2020).

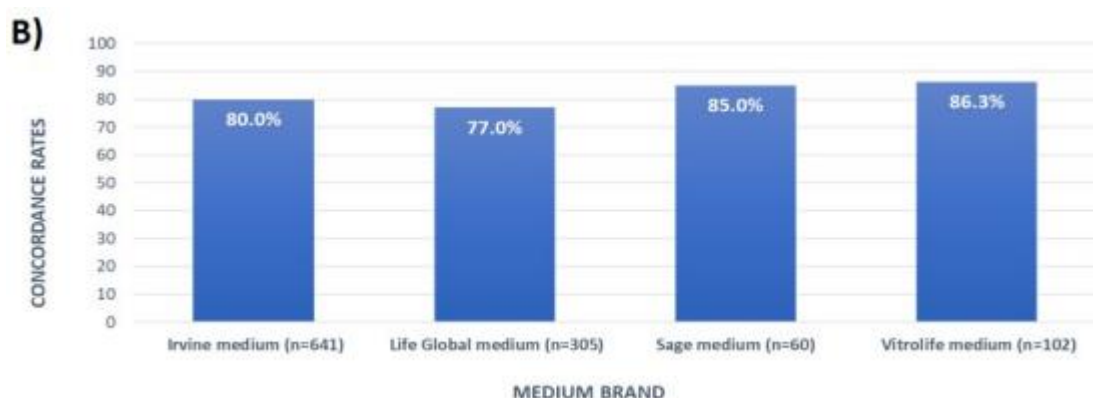
A causa de los datos obtenidos, se realizó un estudio de la tasa de correlación según la edad materna, obteniendo una línea de tendencia significativa, aumentando según la edad (Figura 20), resultado obtenido debido a la disminución de los falsos positivos.



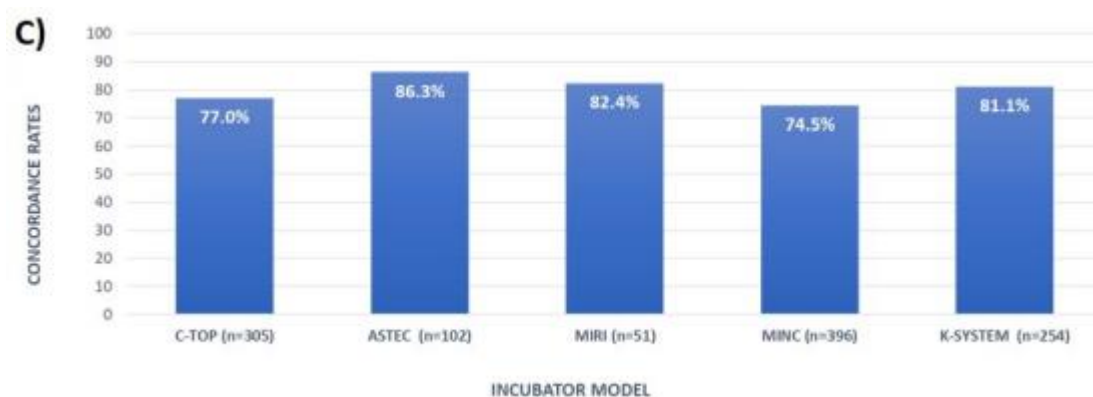
**Fig. 20. Representación sobre la tasa de concordancia entre ambos métodos (Biopsia TE vs niPGT-A) en relación a la edad materna.** Dividido en varios grupos de edades, cada uno con su número de muestras (n). Se observa una clara línea de tendencia a aumentar la tasa de concordancia entre ambos métodos conforme aumenta la edad. Siendo el mayor porcentaje (84,7%) en las edades comprendidas entre los 41 y los 44 años.



En contraste, no se detectaron diferencias significativas en la tasa de correlación al comparar los distintos medios de cultivo de las clínicas (*Figura 21*) o el incubador utilizado (*Figura 22*).



**Fig. 21.** Representación sobre la tasa de concordancia entre ambos métodos (*Biopsia TE vs niPGT-A*) con relación al medio de cultivo obtenido de las distintas clínicas. Aparecen 4 medios de cultivo de 4 clínicas distintas, variando los porcentajes entre un 77% y un 86,3%. No se observan diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de concordancia según la clínica de la que se obtuvieron los medios de cultivo.



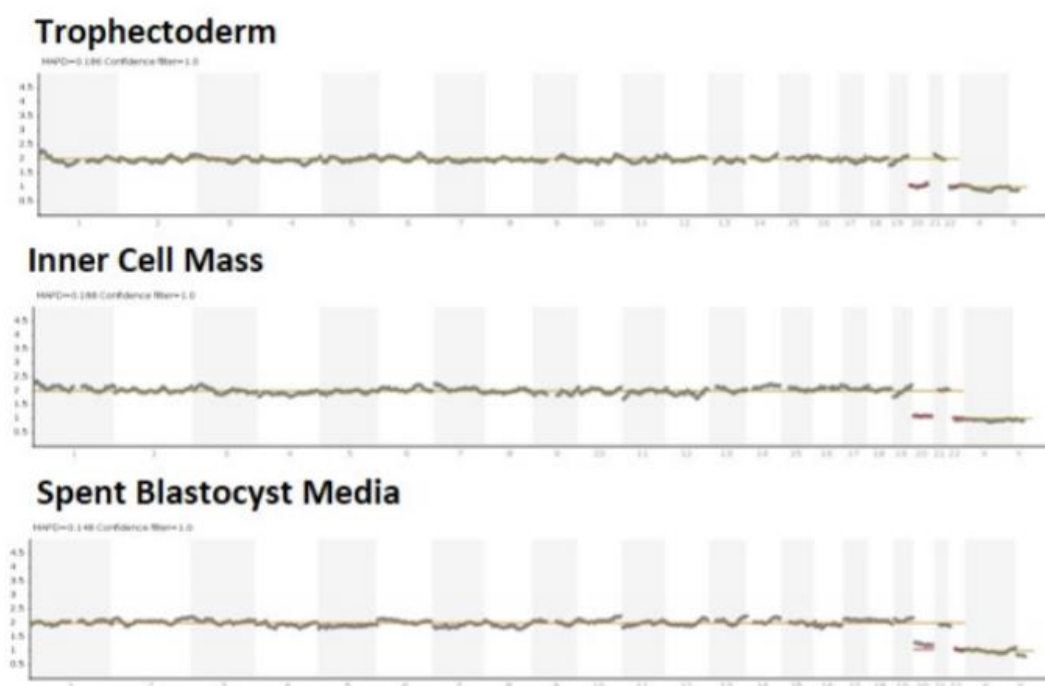
**Fig. 22.** Representación sobre la tasa de concordancia entre ambos métodos (*Biopsia TE vs niPGT-A*) en relación al modelo de incubador utilizado. Aparecen 5 modelos de incubador utilizados por las distintas clínicas, y no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

La tasa de FN fue de un 8,3%, es decir, 92 embriones de los 1108 analizados, de los cuales la mitad eran varones y la otra mitad hembras. En el caso de la tasa de FP, era mayor el porcentaje de varones, 56,2% (77/137), que de hembras, 43,8% (60/137). No obstante, no se encontraron diferencias significativas ni en la sensibilidad (85% en varones y 78,4% en hembras) ni en la especificidad (75% en varones y 79,7% en hembras) de las muestras de cfDNA de ambos sexos. Además, las dos técnicas de fecundación (FIV e ICSI) mostraron valores de sensibilidad (87,9% y 80,9%) y de especificidad (69,9% y 78,6%) muy similares. Asimismo, se sugirió que el tiempo de cultivo es esencial para los

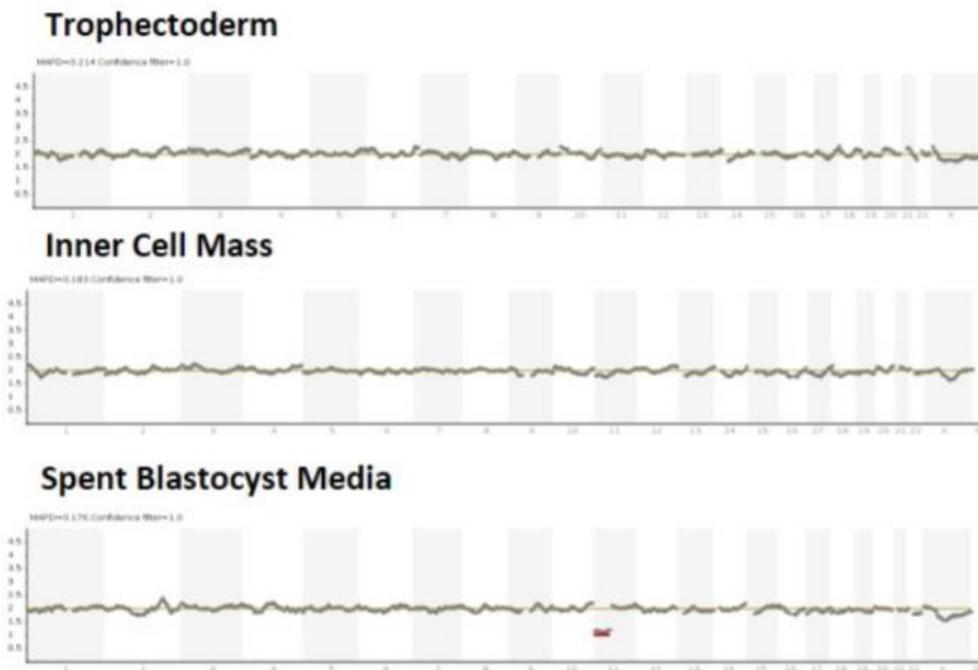
resultados, cuanto mayor sea el tiempo de cultivo, mayor liberación de cfDNA y por lo tanto, mayor es la especificidad.

Por último, se analizó la contribución de la MCI y del TE al cfDNA. Se realizaron 81 biopsias de MCI y se compararon los resultados con los obtenidos de la biopsia de TE y del SCM. De las 81 biopsias de TE, se obtuvieron 79 (97,5%) de resultados informativos, 73 (90,1%) en las muestras de cfDNA y otros 73 (90,1%) en las biopsias de MCI. En total, 64 (79%) muestras mostraron resultados informativos para los tres tipos de muestras

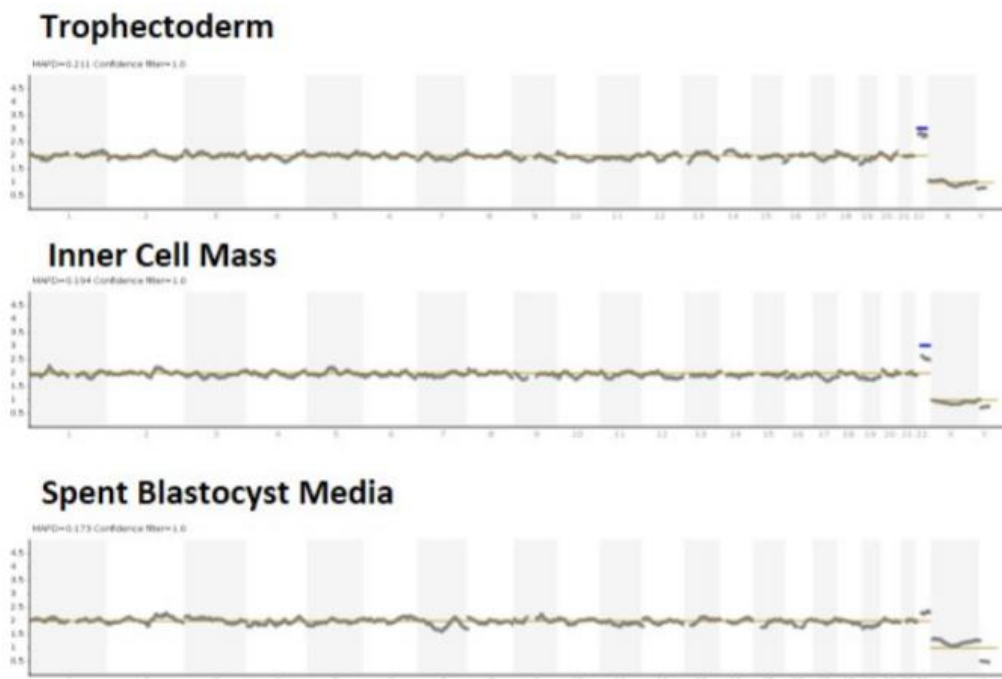
Los resultados obtenidos del cfDNA mostraron una concordancia similar a la biopsia de TE y a la de MCI (87,5% y 84,4%, respectivamente) (*Figura 23*). Excepto 10 muestras distintas, de las cuales 4 correspondían a un diagnóstico aneuploide en el análisis del cfDNA mientras que en la biopsia de MCI era euploide (*Figura 24*), lo que significa que ha podido darse un mosaicismo en el blastocisto debido a que la biopsia de TE también daba resultados aneuploides, estaríamos ante el caso de un falso positivo. Las otras 6 muestras dieron un falso negativo, debido a que el resultado del análisis del cfDNA fue euploide mientras que la MCI era aneuploide (*Figura 25*), probablemente por la presencia de contaminación maternal enmascarando las aneuploidías.



**Fig. 23. Perfiles concordantes obtenidos tras secuenciación de biopsias de TE y biopsia de MCI vs cfDNA del SBM.** Resultados concordantes de las muestras del SBM (del inglés spent blastocyst culture medium) y las biopsias de TE e MCI, en los tres perfiles se puede observar una monosomía del cromosoma 20. Los tres perfiles pertenecen a un embrión varón por lo que no hay contaminación maternal (Rubio et al., 2020).



**Fig. 24.** *Perfiles no concordantes obtenidos tras secuenciación de biopsias de TE y biopsia de MCI vs cfDNA del SBM. Resultados discordantes de las muestras del SBM y las biopsias de TE e MCI. En la muestra del SBM se muestra una monosomía en el cromosoma 11, sin embargo, los otros dos perfiles son completamente euploides (Rubio et al., 2020).*



**Fig. 25.** *Perfiles no concordantes obtenidos tras secuenciación de biopsias de TE y biopsia de MCI vs cfDNA del SBM. Resultados disconcordantes de las muestras del SBM y las biopsias de TE e MCI. En este caso, el perfil del SBM es completamente euploide mientras que los otros dos muestran una trisomía del cromosoma 22 (Rubio et al., 2020).*

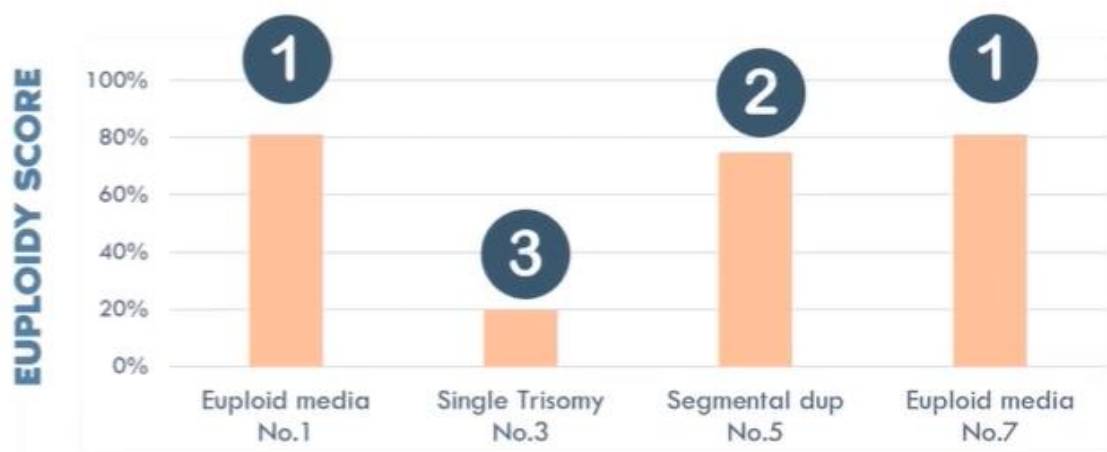
Debido a la especificidad de los resultados de la biopsia de MCI y considerándolo como el resultado real, la concordancia con los resultados del cfDNA y de la biopsia de

TE fueron 84,4% y 87,5% respectivamente. La tasa de FP fue similar para el cfDNA y para la biopsia de TE (6,2% y 10,9% respectivamente), sin embargo, en la tasa de FN había un aumento no significativo en el caso del cfDNA (9,4%) respecto a la biopsia de TE (1,6%) debido principalmente a la contaminación maternal.

Por lo tanto, este sistema de priorización que se quiere aplicar por parte de algunos equipos científicos, están basados en la probabilidad de un embrión de ser euploide, manteniendo en lo más alto de la lista los embriones con una mayor “Euploidy Score” o “Tasa de euploidía”.

Por ejemplo, en la *Figura 26*, los embriones número 1 y número 7 tienen una probabilidad de ser euploides de un 81% por lo que se catalogan en la primera posición de la lista de priorización. En el caso del embrión número 5, tiene una duplicación en un segmento cromosómico del cromosoma 4 (*Figura 26*). Debido a que en el caso de las alteraciones segmentales el 75% de los TE eran normales se les da una prioridad menor que el anterior pero mayor que con otras alteraciones, en un orden 2 en el sistema de priorización (Rubio *et al.*, 2020).

Por último, en el caso del embrión número 3, el cual tiene una anomalía en el cromosoma 17 por completo y en el que la mayoría de las células del TE son anormales se dispondrá como el último en la lista de embriones prioritarios (*Figura 26*).



**Fig. 26.** Gráfica sobre la tasa de euploidía o “Euploidy score” en 4 embriones. En el eje vertical se representa en % de euploidía y en el horizontal los distintos embriones analizados. En el caso del No.1 y el No.7 vemos unos % de “euploidy score” de >80% por lo que se catalogan como 1 en el sistema de priorización. Sin embargo, el No.3 se cataloga como 3 debido a su bajo % de “euploidy score” (Igenomix.com).

## 6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran la fiabilidad y el avance logrado en el uso del niPGT-A, gracias a los últimos estudios realizados en los que se han establecido ciertos protocolos para su realización. Demostrándose que, en ciertos casos, el niPGT-A puede obtener resultados con altas tasas de correlación con la biopsia de TE.

El niPGT-A depende de la liberación del ADN procedente del embrión al medio de cultivo, por lo que es de una gran importancia conocer el origen del ADN analizado. Se describen 4 posibles fuentes de las que puede venir el cfDNA: ADN proveniente de los corpúsculos polares, de las células del cúmulo o de células euploides/aneuploides que sufren apoptosis liberando su contenido al medio.

La contaminación procedente los corpúsculos polares es muy improbable debido a que sufren apoptosis tras su formación. Además, el ADN procedente de los corpúsculos polares es capaz de ocultar el CN del cromosoma Y, incluso degradándolo, antes de comenzar el período de cultivo (Huang *et al.*, 2019).

En el caso de la contaminación de las células del cúmulo, es posible minimizarla mediante su extracción durante la preparación del ICSI. Esto disminuye considerablemente la tasa de diagnóstico erróneo en embriones varones, pasando de tasas de un 63% (Ho *et al.*, 2018) a tasas de diagnóstico erróneo inexistentes (Huang *et al.*, 2019).

Las otras dos fuentes de ADN del medio posibles requieren de una gran atención, debido a que en un embrión en desarrollo ciertas células sufren apoptosis expulsando el ADN al medio. Según varios estudios, tanto las células del TE como las de la MCI pueden sufrir apoptosis, por lo que en el medio de cultivo encontramos ADN de ambos linajes, obteniendo una información más completa que en el caso de la biopsia de TE.

Estos eventos apoptóticos aumentan en frecuencia según aumenta el número total de células en la MCI y la TE en la etapa de blastocisto (Hardy *et al.*, 1989).

Las células aneuploides sufren apoptosis para “aclarar” el embrión (Zhu *et al.*, 2018), aunque no son las únicas, las células euploides también sufre apoptosis expulsando la información al medio de cultivo. El hecho de que haya casos de embriones euploides y nacimientos totalmente sanos tras la implantación de embriones mosaico demuestra la hipótesis de la corrección genética que lleva a cabo el embrión en su desarrollo (Greco *et al.*, 2015; Sachdev *et al.*, 2017).

Además, se demostró en un modelo de ratón mosaico que tanto las células aneuploides como las euploides del TE y de la MCI sufren apoptosis. Con el objetivo de ver la procedencia de las células que sufrían muerte celular, se mostró que un gran porcentaje de las células que sufrían apoptosis procedía de la MCI, tanto células aneuploides (41,4%) como las células euploides (19,5%), en comparación con las células del TE (3,3% y 0,6%) aneuploides y euploides, respectivamente (Bolton *et al.*, 2019).

Las células aneuploides que no sufren apoptosis dan lugar a una aneuploidía en el TE, la MCI o en ambas estructuras. En el caso de que las células difieran entre los linajes, el embrión será un embrión mosaico.

El mosaicismo es uno de los principales problemas del DGP y del análisis o detección de aneuploidías en embriones. Se han estudiado varias formas de minimizarlo u optimizarlo con el fin de evitar los FP y los FN, para impedir la eliminación de embriones aptos y/o la implantación de embriones anormales.

La ventaja del análisis del cfDNA respecto a la biopsia de TE, es que el ADN del SCM viene tanto de la apoptosis de células del TE como de la MCI, aportando información más completa que en el caso de la biopsia de TE. Además, la no invasividad de la técnica es su punto fuerte, el embrión no sufre ningún daño y esta es la razón principal de su interés.

Los cambios usados para optimizar y mejorar el método, minimizando la probabilidad de obtener diagnósticos erróneos debido al mosaicismo, fueron varios. El primero es la recomendación de no usar ningún embrión con un  $CV > 0,19$  debido a la difícil interpretación de perfiles con tales CVs (Huang *et al.*, 2019). El segundo es el establecimiento de un límite de mosaicismo para evitar las variaciones en los perfiles debido al ruido de amplificación o el mosaicismo. En el caso del estudio de Huang *et al.* se estableció un límite de mosaicismo de 60% minimizando los falsos positivos y anulando los falsos negativos lo que permitió obtener mejores datos de FP en niPGT-A que en las muestras de biopsia de TE, demostrando el potencial del análisis del cfDNA, pudiendo incluso superar a las técnicas convencionales en un futuro (Huang *et al.*, 2019).

La supresión de los falsos negativos es muy importante debido a lo que implica, la eliminación de la contaminación materna. Siendo este aspecto una de las principales preocupaciones en el análisis del cfDNA, gracias al paso previo de eliminación de las células de cúmulo.

Gracias a todos estos resultados obtenidos a lo largo de la última década, ha surgido un test no invasivo creado por Igenomix, denominado “Embrace”. El primer test no invasivo que ha salido al mercado que más que un método de selección genética consiste

en un método de priorización para la transferencia de embriones con más posibilidades de ser euploides.

Este método está dirigido a aquellos pacientes que quieren mejorar sus resultados reproductivos comparados con la FIV convencional, con un menor peligro para el embrión. Sobre todo, puede ser un método práctico en países en los que la biopsia embrionaria está prohibida.

El punto clave para la elaboración del “test Embrace” es el sistema de priorización, para ello se tuvo que:

- Definir límites de ploidía: para diferenciar a nivel de cromosoma su normalidad o no, comparando cromosomas normales y anormales, estableciendo el punto de corte en el que se daba la mayor concordancia con los resultados del TE.

- Estimar la tasa de euploidía: en caso de tener un embrión euploide, el porcentaje de concordancia con el TE.

- Establecer una prioridad embrionaria: según la tasa de euploidía se priorizaron antes los resultados con tasas de euploidía más altas.

Pese a los buenos resultados obtenidos en los últimos años, siguen surgiendo cuestiones importantes que no se han resuelto todavía. Como el origen del cfDNA, se sabe que proviene de los dos linajes, TE e MCI, pero no cuanto impacto tiene cada uno, como se fragmenta el ADN y el porqué de esta fragmentación.

Otro de las cuestiones a resolver, es si los resultados pueden mejorar y si el sistema de priorización puede ser una alternativa aceptable a corto plazo.

Por ello, el equipo de Igenomix está preparando un estudio en el que se van a estudiar más de 1000 muestras de embrión de 15 centros con el fin de obtener una mejora de un 10% en la tasa de implantación, comparando transferencias de embrión analizados por medio de cultivo con transferencias de embriones analizados morfológicamente.

En definitiva, la introducción del test no invasivo, pese a que puede tener un futuro prometedor, es un paso atrás en cuanto a la fiabilidad de los tests invasivos que se realizan hoy en día. Las técnicas de biopsia son un método fiable, aunque ciertos estudios presenten posibles inconvenientes para el desarrollo del embrión, hay que plantearse que es más importante, si la fiabilidad del método invasivo, o, por lo contrario, la no invasividad del niPGT-A, lo que lleva a pensar que la celeridad de la puesta a punto de un test no invasivo puede ser una estrategia comercial con el fin de vender un nuevo método distinto a los usados en los últimos años, pese a su incapacidad de seleccionar genéticamente los embriones.

## 7. CONCLUSIONES

Con este trabajo se ha esclarecido todo lo que implica el mundo del diagnóstico genético preimplantacional, demostrando las limitaciones que suponen las técnicas invasivas. Pese a su fiabilidad y a los buenos resultados obtenidos, son técnicas que requieren mucha formación técnica, maquinaria de alto coste y alta probabilidad de diagnósticos erróneos por la falta de información de las células de la MCI y por la contaminación exógena.

Por ello, hay varios grupos de investigación centrados en buscar nuevos métodos no invasivos de diagnóstico genético, obteniendo datos esperanzadores cada año. El niPGT-A puede ser una alternativa a los métodos de diagnóstico convencionales, pero a muy largo plazo. Hoy en día, el único fin que pueden tener los métodos no invasivos son los de complementar a las técnicas convencionales, no sustituirlas.

Es cierto que una de las grandes ventajas del niPGT-A es que no es necesaria la experiencia técnica para realizar la biopsia. También se suele alegar como ventaja que no es necesario equipamiento de alto coste, como el láser necesario para la biopsia. Sin embargo, implantar un protocolo eficiente para niPGT-A requiere de cambios organizativos en el laboratorio, como por ejemplo el cultivo de embriones de forma individualizada, en lugar de en grupo. Por ello, el ahorro del láser seguramente sea sobrepasado por el gasto de nuevos incubadores y cambios en protocolos de trabajo. Además, muchas clínicas con un gran volumen de ciclos ya tienen láser para otros propósitos, como por ejemplo *hatching* asistido. Por lo tanto, desde el punto de vista económico, puede suponer una ventaja para las clínicas pequeñas, pero no tanto así para los centros de gran volumen.

No obstante, la fiabilidad del método no alcanza a la ya corroborada de las técnicas convencionales. Pese a todo esto, se ha ido avanzando mucho en la detección de alteraciones genéticas a partir de ADN liberado por el embrión en un medio de cultivo.

Ha quedado demostrado que el cfDNA se puede amplificar y analizar mediante NGS para realizar un análisis genético del embrión con el fin de detectar posibles anomalías, por lo que se puede considerar el cfDNA como representativo del contenido cromosómico del embrión.

Además, se ha estudiado la correlación del cfDNA con las células de la MCI, que son las que van a dar lugar al feto, y se han obtenido altas tasas de concordancia. Al igual que las tasas de concordancia con las técnicas invasivas, concretamente, las biopsias de TE,



que son las más utilizadas hoy en día, en las que se obtuvo una correlación del 85%, a diferencia de las tasas de correlación obtenidas al inicio de los estudios con métodos no invasivos en los cuales no se superaba el 5% de concordancia.

Pese a los resultados esperanzadores obtenidos, todavía hace falta obtener información sobre el origen del cfDNA y la abolición de los posibles falsos positivos, debido a que los falsos negativos ya se han conseguido eliminar en diversos estudios. Además, aunque ya se han establecido ciertas técnicas para minimizar el mosaicismo, como el uso de un límite, es necesario un estudio más exhaustivo para evitar posibles diagnósticos erróneos.

Finalmente, queda claro que el niPGT-A se ha posicionado como una gran alternativa en un futuro. No obstante, la utilidad de la técnica no es suficiente para implantarla en las clínicas de reproducción. Al ser un campo en el que se busca la innovación constante, ya se están comercializando test que, pese a que no sirven como selección genética, se venden como un sistema de priorización de embriones que puede mejorar las tasas de embarazo. Puesto que existen países en los que la biopsia embrionaria no está permitida, este tipo de prueba puede ser una alternativa a corto plazo.

## CONCLUSIONS

This work has clarified everything that the world of preimplantation genetic diagnosis entails, demonstrating the limitations of invasive techniques, despite their reliability and the good results obtained, they are techniques that require a lot of technical training, high-cost machinery and high probability of misdiagnoses due to the lack of information from ICM cells and exogenous contamination.

For this reason, there are several research groups focused on looking for new non-invasive methods of genetic diagnosis, obtaining hopeful improvements each year. niPGT-A could be an alternative to conventional diagnostic methods in the long-term. Today, the only purpose non-invasive methods have is to complement conventional techniques, not to replace them.

One of the great advantages of niPGT-A indeed is that no technical expertise is necessary to perform the biopsy. It is also claimed as an advantage that high-cost equipment is not necessary, such as the laser needed for biopsy. However, implementing an efficient protocol for niPGT-A requires organizational changes in the laboratory, such as the cultivation of embryos individually, rather than as a group. Therefore, the laser savings are sure to be surpassed by the expense of new incubators and the changes in

working protocols. In addition, many clinics with a large volume of cycles already have lasers for other purposes, like assisted hatching. Consequently, from an economic point of view, it could be an advantage for small clinics, except for high-volume centres.

However, the reliability of the method does not reach conventional techniques. Despite all of this, a notably progress has been made in detecting genetic alterations from DNA released by the embryo in a culture medium.

It has been shown that cfDNA can be amplified and analysed using NGS to perform a genetic analysis of the embryo to detect possible abnormalities. For this reason, cfDNA can be considered as representative of the chromosome content of the embryo.

In addition, the correlation of cfDNA with ICM cells, which are the ones that will give rise to the fetus, has been studied and high concordance rates has been obtained. As the rates of concordance with invasive techniques, specifically, TE biopsies, which are the most commonly used today, obtained (85% concordance rates), in contrast to the rates obtained at the beginning of studies with non-invasive methods in which 5% concordance were not exceeded.

Despite the hopeful results, information on the origin of cfDNA and the abolition of possible false positives are still needed, as false negatives have been avoided in various studies. In addition, certain techniques have already been established to minimize mosaicism, such as the use of a threshold. More studies are still needed to avoid possible misdiagnosis.

Finally, niPGT-A has positioned itself as a great alternative for the future. However, the usefulness of it is not enough to be introduced into the reproduction clinics. Due to the constant innovation required in the genetical reproductive field, tests are already been commercialised, although they do not work as a genetic selection. In fact, they are sold as an embryo prioritization system that can improve pregnancy rates. Given that there are countries where embryonic biopsy is not allowed, this test may be a short-term alternative.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alpha Scientists in Reproductive, Medicine, and Eshre Special Interest Group of Embryology. 'The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting'. Hum. Reprod. 2011; 26: 1270–1283
- Assou, S., Aït-Ahmed, O., El Messaoudi, S., Thierry, A. R., & Hamamah, S. (2014). Non-invasive pre-implantation genetic diagnosis of X-linked disorders. Medical Hypotheses, 83(4), 506–508.
- Bianco, B., Christofolini, D. M., Conceição, G. S., & Barbosa, C. P. (2017). Preimplantation genetic diagnosis associated to Duchenne muscular dystrophy. Einstein (Sao Paulo, Brazil), 15(4), 489–491.
- Bick, D. P., & Lau, E. C. (2006). Preimplantation genetic diagnosis. Pediatric clinics of North America, 53(4), 559–577.
- Bolton, H., Graham, S., Van der Aa, N., Kumar, P., Theunis, K., Fernandez Gallardo, E., Voet, T., & Zernicka-Goetz, M. (2016). Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. Nature communications, 7, 11165.
- Bourdon, M., Pocate-Cheriet, K., Finet de Bantel, A., Grzegorzczuk-Martin, V., Amar Hoffet, A., Arbo, E., Poulain, M., & Santulli, P. (2019). Day 5 versus Day 6 blastocyst transfers: a systematic review and meta-analysis of clinical outcomes. Human reproduction (Oxford, England), 34(10), 1948–1964.
- Brouillet, S., Martinez, G., Coutton, C., & Hamamah, S. (2020). Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. Reproductive biomedicine online, 40(6), 779–796.
- Bustamante-Aragón, A., Fernández, E., Peciña, A., Rueda, J., Ramos, C., Giménez, C., Monfort, S., Rubio, C. (2016). Guía de buenas prácticas en diagnóstico genético preimplantacional. Medicina Reproductiva y Embriología Clínica, 3(2), 104–111.
- Capalbo, A., Ubaldi, F. M., Rienzi, L., Scott, R., & Treff, N. (2017). Detecting mosaicism in trophectoderm biopsies: current challenges and future possibilities. Human reproduction (Oxford, England), 32(3), 492–498.
- Capalbo, A., Romanelli, V., Patassini, C., Poli, M., Girardi, L., Giancani, A., Stoppa, M., Cimadomo, D., Ubaldi, F.M., Rienzi, L. (2018). Diagnostic efficacy of blastocoel fluid and spent media as sources of DNA for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions. Fertility and Sterility, 110(5), 870–879.e5.
- Carmona Serrano, C. (2015). Diagnóstico genético preimplantacional: Revisión de la metodología y de las aplicaciones clínicas actuales. Trabajo fin de grado Universidad Politécnica de Valencia.
- Cieslakjanzen, J., Turkaspa, I., Ilkevitch, Y., Bernal, A., Morris, R., & Verlinsky, Y. (2006). Multiple micromanipulations for preimplantation genetic diagnosis do not affect embryo development to the blastocyst stage. Fertility and Sterility, 85(6), 1826–1829.
- Cimadomo, D., Capalbo, A., Ubaldi, F. M., Scarica, C., Palagiano, A., Canipari, R., & Rienzi, L. (2016). The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. BioMed research international, 2016, 7193075.
- Cimadomo, D., Rienzi, L., Giancani, A., Alviggi, E., Dusi, L., Canipari, R., Noli, L., Ilic, D., Khalaf, Y., Ubaldi, F. M., & Capalbo, A. (2019). Definition and

- validation of a custom protocol to detect miRNAs in the spent media after blastocyst culture: searching for biomarkers of implantation. *Human reproduction* (Oxford, England), 34(9), 1746–1761.
- Cimadomo, D., Rienzi, L., Capalbo, A., Rubio, C., Innocenti, F., García-Pascual, C. M., Ubaldi, F. M., & Handyside, A. (2020). The dawn of the future: 30 years from the first biopsy of a human embryo. The detailed history of an ongoing revolution. *Human reproduction update*, dmaa019. Advance online publication.
  - Dahdouh, E. M., Balayla, J., & García-Velasco, J. A. (2015). Impact of blastocyst biopsy and comprehensive chromosome screening technology on preimplantation genetic screening: a systematic review of randomized controlled trials. *Reproductive biomedicine online*, 30(3), 281–289.
  - Dreesen, J., Destouni, A., Kourlaba, G., Degn, B., Mette, W. C., Carvalho, F., Moutou, C., Sengupta, S., Dhanjal, S., Renwick, P., Davies, S., Kanavakis, E., Harton, G., Traeger-Synodinos, J. (2013). Evaluation of PCR-based preimplantation genetic diagnosis applied to monogenic diseases: a collaborative ESHRE PGD consortium study. *European Journal of Human Genetics*, 22(8), 1012–1018.
  - Feichtinger, M., Vaccari, E., Carli, L., Wallner, E., Mädler, U., Figl, K., Palini, S., & Feichtinger, W. (2017). Non-invasive preimplantation genetic screening using array comparative genomic hybridization on spent culture media: a proof-of-concept pilot study. *Reproductive biomedicine online*, 34(6), 583–589.
  - Fiorentino, F., Biricik, A., Nuccitelli, A., De Palma, R., Kahraman, S., Iacobelli, M., Trengia, V., Caserta, D., Bonu, M. A., Borini, A., & Baldi, M. (2006). Strategies and clinical outcome of 250 cycles of Preimplantation Genetic Diagnosis for single gene disorders. *Human reproduction* (Oxford, England), 21(3), 670–684.
  - Fiorentino, F., Kokkali, G., Biricik, A., Stavrou, D., Ismailoglu, B., De Palma, R., Arizzi, L., Harton, G., Sessa, M., & Pantos, K. (2010). Polymerase chain reaction-based detection of chromosomal imbalances on embryos: the evolution of preimplantation genetic diagnosis for chromosomal translocations. *Fertility and sterility*, 94(6), 2001–2011.e20116.
  - Foresta, C., Garolla, A., Bartoloni, L., Bettella, A., & Ferlin, A. (2005). Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(1), 152–156.
  - Forman, E. J., Tao, X., Ferry, K. M., Taylor, D., Treff, N. R., & Scott, R. T., Jr (2012). Single embryo transfer with comprehensive chromosome screening results in improved ongoing pregnancy rates and decreased miscarriage rates. *Human reproduction* (Oxford, England), 27(4), 1217–1222.
  - Fragouli, E., Alfarawati, S., Daphnis, D. D., Goodall, N. N., Mania, A., Griffiths, T., Gordon, A., & Wells, D. (2011). Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Human reproduction* (Oxford, England), 26(2), 480–490.
  - Franasiak, J. M., Forman, E. J., Hong, K. H., Werner, M. D., Upham, K. M., Treff, N. R., & Scott, R. T. (2014). The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertility and Sterility*, 101(3), 656–663.e1.

- Galluzzi, L., Palini, S., Stefani, S., Andreoni, F., Primiterra, M., Diotallevi, A., Bulletti, C., & Magnani, M. (2015). Extracellular embryo genomic DNA and its potential for genotyping applications. *Future science OA*, 1(4), FSO62.
- Gardner, R. L., & Edwards, R. G. (1968). Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature*, 218(5139), 346–349.
- Giacomini, E., Vago, R., Sanchez, A. M., Podini, P., Zarovni, N., Murdica, V., Rizzo, R., Bortolotti, D., Candiani, M., & Viganò, P. (2017). Secretome of in vitro cultured human embryos contains extracellular vesicles that are uptaken by the maternal side. *Scientific reports*, 7(1), 5210.
- Gianaroli, L., Magli, M. C., Cavallini, G., Crippa, A., Nadalini, M., Bernardini, L., Menchini Fabris, G. F., Voliani, S., & Ferraretti, A. P. (2005). Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Human reproduction (Oxford, England)*, 20(8), 2140–2152.
- Grau, N., Escrich, L., Galiana, Y., Meseguer, M., García-Herrero, S., Remohí, J., & Escibá, M. J. (2015). Morphokinetics as a predictor of self-correction to diploidy in tripronucleated intracytoplasmic sperm injection-derived human embryos. *Fertility and sterility*, 104(3), 728–735.
- Greco, E., Minasi, M. G., & Fiorentino, F. (2015). Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. *New England Journal of Medicine*, 373(21), 2089–2090.
- Griffin, D. K., Handyside, A. H., Penketh, R. J. A., Winston, R. M. L., & Delhanty, J. D. A. (1991). Fluorescent in-situ hybridization to interphase nuclei of human preimplantation embryos with X and Y chromosome specific probes. *Human Reproduction*, 6(1), 101–105.
- Grifo, J. A., Boyle, A., Fischer, E., Lavy, G., DeCherney, A. H., Ward, D. C., & Sanyal, M. K. (1990). Preembryo biopsy and analysis of blastomeres by in situ hybridization. *American journal of obstetrics and gynecology*, 163(6 Pt 1), 2013–2019.
- Grifo JA, Boyle A, Tang YX, Ward DC. Preimplantation genetic diagnosis. In situ hybridization as a tool for analysis. *Arch Pathol Lab Med*. 1992;116(4):393-397.
- Hammond, E. R., Shelling, A. N., & Cree, L. M. (2016). Nuclear and mitochondrial DNA in blastocoele fluid and embryo culture medium: evidence and potential clinical use. *Human reproduction (Oxford, England)*, 31(8), 1653–1661.
- Hammond, E. R., McGillivray, B. C., Wicker, S. M., Peek, J. C., Shelling, A. N., Stone, P., Chamley, L. W., & Cree, L. M. (2017). Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertility and sterility*, 107(1), 220–228.e5.
- Handyside, A. H., Kontogianni, E. H., Hardy, K., & Winston, R. M. L. (1990). Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 344(6268), 768–770.
- Handyside, A. H., Lesko, J. G., Tarín, J. J., Winston, R. M. L., & Hughes, M. R. (1992). Birth of a Normal Girl after in Vitro Fertilization and Preimplantation Diagnostic Testing for Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 327(13), 905–909.
- Hardy, K., Handyside, A. H., & Winston, R. M. (1989). The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development (Cambridge, England)*, 107(3), 597–604.

- Harper, J. C., Boelaert, K., Geraedts, J., Harton, G., Kearns, W. G., Moutou, C., Muntjewerff, N., Repping, S., SenGupta, S., Scriven, P. N., Traeger-Synodinos, J., Vesela, K., Wilton, L., & Sermon, K. D. (2006). ESHRE PGD Consortium data collection V: cycles from January to December 2002 with pregnancy follow-up to October 2003. *Human reproduction* (Oxford, England), 21(1), 3–21.
- Harper, J. C., & Sengupta, S. B. (2012). Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011. *Human genetics*, 131(2), 175–186.
- Harton, G. L., Magli, M. C., Lundin, K., Montag, M., Lemmen, J., & Harper, J. C. (2010). ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group--best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Human Reproduction*, 26(1), 41–46.
- Hellani, A., Abu-Amero, K., Azouri, J., & El-Akoum, S. (2008). Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reproductive biomedicine online*, 17(6), 841–847.
- Ho, J. R., Arrach, N., Rhodes-Long, K., Ahmady, A., Ingles, S., Chung, K., Bendikson, K. A., Paulson, R. J., & McGinnis, L. K. (2018). Pushing the limits of detection: investigation of cell-free DNA for aneuploidy screening in embryos. *Fertility and sterility*, 110(3), 467–475.e2.
- Huang, L., Bogale, B., Tang, Y., Lu, S., Xie, X. S., & Racowsky, C. (2019). Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophoctoderm biopsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(28), 14105–14112.
- Jiao, J., Shi, B., Sagnelli, M., Yang, D., Yao, Y., Li, W., Shao, L., Lu, S., Li, D., & Wang, X. (2019). Minimally invasive preimplantation genetic testing using blastocyst culture medium. *Human reproduction* (Oxford, England), 34(7), 1369–1379.
- Kanavakis, E., & Traeger-Synodinos, J. (2002). Preimplantation genetic diagnosis in clinical practice. *Journal of medical genetics*, 39(1), 6–11.
- Kuznyetsov, V., Madjunkova, S., Antes, R., Abramov, R., Motamedi, G., Ibarrientos, Z., & Librach, C. (2018). Evaluation of a novel non-invasive preimplantation genetic screening approach. *PloS one*, 13(5), e0197262.
- Leaver, M., & Wells, D. (2019). Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics? *Human Reproduction Update*.
- Li, P., Song, Z., Yao, Y., Huang, T., Mao, R., Huang, J., Ma, Y., Dong, X., Huang, W., Huang, J., Chen, T., Qu, T., Li, L., Zhong, Y., & Gu, J. (2018). Preimplantation Genetic Screening with Spent Culture Medium/Blastocoel Fluid for in Vitro Fertilization. *Scientific reports*, 8(1), 9275.
- Liu, W., Liu, J., Du, H., Ling, J., Sun, X., & Chen, D. (2017). Non-invasive pre-implantation aneuploidy screening and diagnosis of beta thalassemia IVSII654 mutation using spent embryo culture medium. *Annals of medicine*, 49(4), 319–328.
- Lo, Y. M. D., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W., & Wainscoat, J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet*, 350(9076), 485–487.
- Magli, M. C., Albanese, C., Crippa, A., Tabanelli, C., Ferraretti, A. P., & Gianaroli, L. (2019). Deoxyribonucleic acid detection in blastocoelic fluid: a new predictor of embryo ploidy and viable pregnancy. *Fertility and sterility*, 111(1), 77–85.

- Maheshwari, A., Pandey, S., Amalraj Raja, E., Shetty, A., Hamilton, M., & Bhattacharya, S. (2018). Is frozen embryo transfer better for mothers and babies? Can cumulative meta-analysis provide a definitive answer? *Human reproduction update*, 24(1), 35–58.
- Malik S. (2012). Syndactyly: phenotypes, genetics and current classification. *European journal of human genetics: EJHG*, 20(8), 817–824.
- McCoy, R. C. (2017). Mosaicism in Preimplantation Human Embryos: When Chromosomal Abnormalities Are the Norm. *Trends in Genetics*, 33(7), 448–463.
- Middelburg, K. J., Heineman, M. J., Haadsma, M. L., Bos, A. F., Kok, J. H., & Hadders-Algra, M. (2010). Neurological Condition of Infants Born After In Vitro Fertilization With Preimplantation Genetic Screening. *Pediatric Research*, 67(4), 430–434.
- Milachich, T. (2014). New Advances of Preimplantation and Prenatal Genetic Screening and Noninvasive Testing as a Potential Predictor of Health Status of Babies. *BioMed Research International*, 2014, 1–8.
- Mittal, T. K., Vujanić, G. M., Morrissey, B. M., & Jones, A. (1998). Triploidy: antenatal sonographic features with post-mortem correlation. *Prenatal diagnosis*, 18(12), 1253–1262.
- Monk, M., & Handyside, A. H. (1988). Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. *Journal of reproduction and fertility*, 82(1), 365–368.
- Montag, M., Köster, M., Strowitzki, T., & Toth, B. (2013). Polar body biopsy. *Fertility and Sterility*, 100(3), 603–607.
- Moreno, J.M (2007). Biopsia embrionaria “Aspectos técnicos”. *Revista ASEBIR*. Vol 12. Nº1.
- Morris, J. K., Mutton, D. E., & Alberman, E. (2005). Recurrences of free trisomy 21: analysis of data from the National Down Syndrome Cytogenetic Register. *Prenatal diagnosis*, 25(12), 1120–1128.
- Munné, S., Lee, A., Rosenwaks, Z., Grifo, J., & Cohen, J. (1993). Fertilization and early embryology: Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Human Reproduction*, 8(12), 2185–2191.
- Munné, S., Weier, H. U., Grifo, J., & Cohen, J. (1994). Chromosome mosaicism in human embryos. *Biology of reproduction*, 51(3), 373–379.
- Munné, S., Fung, J., Cassel, M. J., Márquez, C., & Weier, H. U. (1998). Preimplantation genetic analysis of translocations: case-specific probes for interphase cell analysis. *Human genetics*, 102(6), 663–674.
- Munné, S., Chen, S., Fischer, J., Colls, P., Zheng, X., Stevens, J., Escudero, T., Oter, M., Schoolcraft, B., Simpson, J. L., & Cohen, J. (2005). Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertility and sterility*, 84(2), 331–335.
- Munné, S., Chen, S., Colls, P., Garrisi, J., Zheng, X., Cekleniak, N., Lenzi, M., Hughes, P., Fischer, J., Garrisi, M., Tomkin, G., & Cohen, J. (2007a). Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reproductive biomedicine online*, 14(5), 628–634.
- Munné, S., Gianaroli, L., Tur-Kaspa, I., Magli, C., Sandalinas, M., Grifo, J., Cram, D., Kahraman, S., Verlinsky, Y., & Simpson, J. L. (2007b). Substandard application of preimplantation genetic screening may interfere with its clinical success. *Fertility and sterility*, 88(4), 781–784.

- Munné S. (2012). Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization. *Current genomics*, 13(6), 463–470
- Palini, S., Galluzzi, L., De Stefani, S., Bianchi, M., Wells, D., Magnani, M., & Bulletti, C. (2013). Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reproductive BioMedicine Online*, 26(6), 603–610.
- Porter, R., Han, T., Tucker, M. J., Graham, J., Liebermann, J., & Sills, E. S. (2003). Estimation of second polar body retention rate after conventional insemination and intracytoplasmic sperm injection: in vitro observations from more than 5000 human oocytes. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 20(9), 371–376.
- Ratan, ZA, Zaman, SB, Mehta, V., Haidere, MF, Runa, NJ y Akter, N. (2017). Aplicación de la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH) para la detección de aberraciones genéticas en la ciencia médica. *Cureus* , 9 (6), e1325.
- Rubio, C., Pehlivan, T., Rodrigo, L., Simón, C., Remohí, J., & Pellicer, A. (2005). Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y.: 1989), 53(4), 159–165.
- Rubio, C., Bellver, J., Rodrigo, L., Castellón, G., Guillén, A., Vidal, C., Giles, J., Ferrando, M., Cabanillas, S., Remohí, J., Pellicer, A., Simón, C. (2017). In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. *Fertility and Sterility*, 107(5), 1122–1129.
- Rubio, C., Rienzi, L., Navarro-Sánchez, L., Cimadomo, D., García-Pascual, C. M., Albricci, L., Soscia, D., Valbuena, D., Capalbo, A., Ubaldi, F., & Simón, C. (2019). Embryonic cell-free DNA versus trophoctoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertility and sterility*, 112(3), 510–519.
- Rubio, C., Navarro-Sánchez, L., García-Pascual, C. M., Ocali, O., Cimadomo, D., Venier, W., Barroso, G., Kopcow, L., Bahçeci, M., Roos Kulmann, M. I., López, L., De la Fuente, E., Navarro, R., Valbuena, D., Sakkas, D., Rienzi, L., & Simón, C. (2020). Multicenter prospective study of concordance between embryo cell-free DNA and trophoctoderm biopsies from 1,301 human blastocysts. *American journal of obstetrics and gynecology*, S0002-9378(20)30520-2.
- Sachdev, N. M., Maxwell, S. M., Besser, A. G., & Grifo, J. A. (2017). Diagnosis and clinical management of embryonic mosaicism. *Fertility and Sterility*, 107(1), 6–11.
- Scholz, N. B., Bolund, L., Nyegaard, M., Faaborg, L., Jørgensen, M. W., Lund, H., Niemann, I., & Sunde, L. (2015). Triploidy--Observations in 154 Diandric Cases. *PloS one*, 10(11), e0142545.
- Scott, R. T., Jr, Upham, K. M., Forman, E. J., Zhao, T., & Treff, N. R. (2013). Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertility and sterility*, 100(3), 624–630.
- Sepulveda, S y Portella, J (2012). Diagnóstico genético preimplantacional: alcances y límites. *Rev peru ginecol obstet.* 2012; 58: 207-211
- Shamonki, M. I., Jin, H., Haimowitz, Z., & Liu, L. (2016). Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of



- cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertility and sterility*, 106(6), 1312–1318.
- Simpson, J. L. (2010). Preimplantation genetic diagnosis at 20 years. *Prenatal Diagnosis*, 30(7), 682–695.
  - Siristatidis, C. S., Sertedaki, E., Vaidakis, D., Varounis, C., & Trivella, M. (2018). Metabolomics for improving pregnancy outcomes in women undergoing assisted reproductive technologies. *The Cochrane database of systematic reviews*, 3(3), CD011872.
  - Steptoe, P. C., & Edwards, R. G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet (London, England)*, 2(8085), 366.
  - Stigliani, S., Anserini, P., Venturini, P. L., & Scaruffi, P. (2013). Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Human Reproduction*, 28(10), 2652–2660.
  - Strom, C. M., Verlinsky, Y., Milayeva, S., Evsikov, S., Cieslak, J., Lifchez, A., Valle, J., Moise, J., Ginsberg, N., & Applebaum, M. (1990). Preconception genetic diagnosis of cystic fibrosis. *Lancet (London, England)*, 336(8710), 306–307.
  - Tannus, S., Cohen, Y., Henderson, S., Al Ma'mari, N., Shavit, T., Son, W.-Y., & Dahan, M. H. (2018). Fresh transfer of Day 5 slow-growing embryos versus deferred transfer of vitrified, fully expanded Day 6 blastocysts: which is the optimal approach? *Human Reproduction*.
  - Toufaily, M. H., Roberts, D. J., Westgate, M.-N., & Holmes, L. B. (2015). Triploidy. *American Journal of Clinical Pathology*, 145(1), 86–95.
  - Treff, N. R., & Zimmerman, R. S. (2017). Advances in Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disease and Aneuploidy. *Annual review of genomics and human genetics*, 18, 189–200.
  - Ugajin, T., Terada, Y., Hasegawa, H., Velayo, C. L., Nabeshima, H., & Yaegashi, N. (2010). Aberrant behavior of mouse embryo development after blastomere biopsy as observed through time-lapse cinematography. *Fertility and Sterility*, 93(8), 2723–2728.
  - Veiga, A., Santaló, J., Vidal, F., Calderón, G., Giménez, C., Boada, M., Egozcue, J., & Barri, P. N. (1994). Twin pregnancy after preimplantation diagnosis for sex selection. *Human reproduction (Oxford, England)*, 9(11), 2156–2159.
  - Vera-Rodriguez, M., & Rubio, C. (2017). Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos. *Fertility and sterility*, 107(5), 1107–1112.
  - Vera-Rodriguez, M., Diez-Juan, A., Jimenez-Almazan, J., Martinez, S., Navarro, R., Peinado, V., Mercader, A., Meseguer, M., Blesa, D., Moreno, I., Valbuena, D., Rubio, C., & Simon, C. (2018). Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Human reproduction (Oxford, England)*, 33(4), 745–756.
  - Verdyck, P., Berckmoes, V., De Vos, A., Verpoest, W., Liebaers, I., Bonduelle, M., & De Rycke, M. (2015). Chromosome fragility at FRAXA in human cleavage stage embryos at risk for fragile X syndrome. *American journal of medical genetics. Part A*, 167A(10), 2306–2313.
  - Verlinsky, Y., Ginsberg, N., Lifchez, A., Valle, J., Moise, J., & Strom, C. M. (1990). Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Human Reproduction*, 5(7), 826–829.
  - Verlinsky, Y. (1996). Preimplantation genetic diagnosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 13(2), 87–89.

- Wu, H., Ding, C., Shen, X., Wang, J., Li, R., Cai, B., Xu, Y., Zhong, Y., & Zhou, C. (2015). Medium-based noninvasive preimplantation genetic diagnosis for human  $\alpha$ -thalassemias-SEA. *Medicine*, 94(12), e669.
- Xu, J., Fang, R., Chen, L., Chen, D., Xiao, J. P., Yang, W., Wang, H., Song, X., Ma, T., Bo, S., Shi, C., Ren, J., Huang, L., Cai, L. Y., Yao, B., Xie, X. S., & Lu, S. (2016). Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(42), 11907–11912.
- Yang, L., Lv, Q., Chen, W., Sun, J., Wu, Y., Wang, Y., Chen, X., Chen, X., & Zhang, Z. (2017). Presence of embryonic DNA in culture medium. *Oncotarget*, 8(40), 67805–67809.
- Zacchini, F., Arena, R., Abramik, A., & Ptak, G. E. (2017). Embryo biopsy and development: the known and the unknown. *Reproduction (Cambridge, England)*, 154(5), R143–R148.
- Zhang, S., Luo, K., Cheng, D., Tan, Y., Lu, C., He, H., Gu, Y., Lu, G., Gong, F., Lin, G. (2016). Number of biopsied trophectoderm cells is likely to affect the implantation potential of blastocysts with poor trophectoderm quality. *Fertility and Sterility*, 105(5), 1222–1227.e4.
- Zhu, P., Guo, H., Ren, Y., Hou, Y., Dong, J., Li, R., Lian, Y., Fan, X., Hu, B., Gao, Y., Wang, X., Wei, Y., Liu, P., Yan, J., Ren, X., Yuan, P., Yuan, Y., Yan, Z., Wen, L., Yan, L., Qiao, J., Tang, F. (2018). Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. *Nature genetics*, 50(1), 12–19.